

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Baromfi eredetű enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC)
törzsek epidemiológiája, antibiotikum rezisztenciája és
virulencia profilja.**

Epidemiology, antimicrobial resistance and virulence profiles of
avian enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).

PhD értekezés

Dr. Adorján András

2022

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Tóth István
Eötvös Loránd Kutatási Hálózat
Állatorvostudományi Kutató Intézet
témavezető

.....
Dr. Könyves László
Állatorvostudományi Egyetem,
Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika
társtémavezető

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....
Dr. Adorján András

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések	4
2	Összefoglalás.....	5
3	Abstract.....	6
4	Bevezetés	7
5	Irodalmi áttekintés	8
5.1	<i>Escherichia coli</i> előfordulása	8
5.2	Patogén <i>Escherichia coli</i> törzsek besorolása.....	9
5.3	<i>E. coli</i> törzsekben előforduló O-K-H-F antigének.....	9
5.4	<i>E. coli</i> patotípusok elkülönítése	10
5.5	EPEC és EHEC törzsek elkülönítése.....	10
5.6	Az enteropatogén <i>Escherichia coli</i> (EPEC).....	11
5.7	A tipikus enteropatogén <i>Escherichia coli</i> (tEPEC)	12
5.8	Az atipikus enteropatogén <i>Escherichia coli</i> (aEPEC).....	13
6	Célkitűzések.....	17
7	Multirezisztens aEPEC törzsek izolálása brojlerekből.....	18
7.1	Anyagok és módszerek	18
7.1.1	Mintagyűjtés és <i>E. coli</i> izolálás	18
7.1.2	Fenotípusos vizsgálatok (antibiotikum rezisztencia és szerotípus).....	18
7.1.3	Molekuláris genetikai vizsgálatok.....	19
7.1.4	Statisztikai elemzés	22
7.2	Eredmények.....	23
7.2.1	Izolált baktériumok és molekuláris genetikai vizsgálatuk.....	23
7.2.2	Szerocsoportok az aEPEC esetében.....	24
7.2.3	Antibiotikum rezisztencia	26
7.3	Megbeszélés.....	29
8	Az aEPEC első leírása lúdból (<i>Anser anser domestica</i>) és aEPEC első közlése pulykákból és galambokból Magyarországon.	31
8.1	Anyagok és módszerek	31
8.1.1	Mintagyűjtés	31
8.1.2	Bakteriológia vizsgálatok	31
8.1.3	Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok.....	31
8.1.4	Molekuláris genetikai vizsgálatok.....	32
8.1.5	<i>E. coli</i> törzsek filogenetikai besorolása	32
8.1.6	Az <i>eae</i> pozitív <i>E. coli</i> törzsek szerotipizálása.....	33
8.1.7	Statisztikai elemzések	33
8.2	Eredmények.....	33
8.2.1	Baktérium törzsek.....	33
8.2.2	Kimutatott <i>E. coli</i> patotípusok	35

8.2.3	Az aEPEC törzseink filogenetikai besorolása, szerotipizálása, antibiotikum rezisztenciája	35
8.3	Megbeszélés	37
9	Összegző megbeszélés	39
10	Új tudományos eredmények	42
11	Irodalom	43
12	A doktori kutatás eredményeinek közlései	54
13	Köszönetnyilvánítás	55

1 Rövidítések

APEC – madár patogén/avian pathogenic *Escherichia coli*
aEPEC – atipikus enteropatogén/atypical enteropathogenic *Escherichia coli*
AIEC – adhéziós-invazív/adherent-invasive *Escherichia coli*
BFP - köteg képző pilus/bundle-forming pilus
bp – bázis pár
CI – konfidencia intervallum/confidence interval
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
DAEC – diffúzan tapadó/diffusely adherent *Escherichia coli*
DEC – intesztinális patogén/diarrheagenic pathogenic *Escherichia coli*
EAEC – enteroaggregatív/enteroaggregative *Escherichia coli*
EAF – EPEC adhéziós faktor
EHEC – enterohemoragiás/enterohaemorrhagic *Escherichia coli*
EIEC – enteroinvazív/enteroinvasive *Escherichia coli*
EPEC – enteropatogén/enteropathogenic *Escherichia coli*
ETEC – enterotoxikus/enterotoxigenic *Escherichia coli*
ExPEC – extraintesztinális patogén/extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*
LB – Luria-Bertani
LEE – Locus of Enterocyte Effacement
MALDI-TOF – mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő/matrix-assisted laser desorption, ionization, time of flight
MDR – multidrog rezisztens/multidrug-resistant
MNEC – agyhártyagyulladást okozó/meningitis-associated *Escherichia coli*
Nébih-ÁDI – Nemzeti Élelmiszerláncbiztonsági Hivatal – Állategészségügyi Diagnosztikai Intézet
NT – nem tipizálható/not typable
PCR – polimeráz láncreakció/polymerase chain reaction
PEMS – baromfi bélgyulladás és felszívódási zavar szindróma/poultry enteritis and malabsorption syndrome
rpm – fordulat per perc/round per minutes
SP – spontán agglutináció/spontaneous agglutination
tEPEC – tipikus enteropatogén/typical enteropathogenic *Escherichia coli*
UPEC – uropatogén/uropathogenic *Escherichia coli*

2 Összefoglalás

Az *Escherichia coli* egy széles körben előforduló, többnyire kommenzalista baktérium, de léteznek humán-, és állategészségügyi szempontból jelentős intesztinális és extraintesztinális patogén törzsei is. Az intesztinális *E. coli* törzsek patotípusainak baromfiban való előfordulásáról jelenleg még igen kevés információval rendelkezünk, magyarországi adat pedig az itt ismertetett adataink publikálásáig még egyáltalán nem volt. Ezért célunk volt először egy brojlerekre fókuszáló majd ezt követően egy öt baromfi fajt (tyúk, pulyka, lúd, kacska, galamb) felölelő vizsgálat az esetlegesen előforduló enterális *E. coli* patotípusokra, s ezen belül is elsősorban az EPEC törzsekre, valamint ezen törzsek jellemzése és előfordulásuk járványtani viszonyaira való adatgyűjtés.

A Nébih-ÁDI brojler *E. coli* referencia törzsgyűjteményéből 170 törzset, vágóhídi brojlerekből 114 vakbél- és 4 vágóhídi szennyvízmintát (összesen 288 *E. coli* törzset) vizsgáltunk meg. A kutatás során azt tapasztaltuk, hogy a mintákban csak az aEPEC (atipikus enteropatogén *E. coli*) fordult elő, viszont ez a patotípus váratlan gyakorisággal, 28-30%-ban jelen volt a mintákban. Az izolált aEPEC törzsek 94 és 98%-a multirezisztensnek bizonyult 15-féle klinikailag releváns antibiotikumot megvizsgálva és szerocsoportjaik is igen változatosak voltak. Összegezve, a brojlerekben végzett vizsgálatainkkal először sikerült Magyarországon brojlerekből aEPEC törzseket kimutatni, amelyek nagymértékben multirezisztensnek voltak, nagy számban fordultak elő és változatos szerocsoportba (O14, O45, O108) tartoztak, feltűnően gyakori (25%-os) B2 filogenetikai reprezentációban.

Hasonló eredményt tapasztaltunk a 45 csirkéből, 56 pulykából, 89 kacsából, 105 lúdból, 37 galambból származó 319 *E. coli* izolátumot megvizsgálva. A mintákban csak aEPEC törzseket sikerült kimutatni, összesen 7 esetben. Az alacsony esetszám következménye lehet annak, hogy ezen mintákat eltérő életkorokból gyűjtöttük, hogy az életkor esetleges szerepét is megvizsgálhassuk az aEPEC gyakoriságában. Eredményeink azt mutatták, hogy a fiatal és kifejlett állatok életkorában az aEPEC patotípus nem volt kimutatható. Inkább a még fejlődésben lévő 4-6 hetes korosztály, illetve a betegségben szenvedő (elhullott), vagy stressznek (pl: tömés) kitett állatokban jelenik meg ez a patotípus. Az eltérő baromfi fajokból izolált törzsek változatos szerocsoportokba tartoztak és a galambokból izoláltak kivételével multirezisztensek voltak. Így az elvégzett kutatással sikerült elsőként ludakból (*Anser anser domestica*) az aEPEC jelenlétét igazolni, valamint Magyarországon pulykából és galambokból elsőként aEPEC törzseket ismertetni. Ezen túl, az aEPEC életkori eloszlásának lehetséges különbségeire is felhívtuk a figyelmet. Mindamellet, a patotípus fajok közötti változatossága is tetten érhető volt a fajok között.

3 Abstract

E. coli is a widely distributed, mainly commensal bacterium, but some strains have human and veterinary medical importance causing intestinal or extraintestinal infections. However, there is scarce information about the existence of diarrheagenic *E. coli* (DEC) strains in poultry and so far there were no data available on avian DEC from Hungary. Therefore, our aim was to conduct a survey of DEC in broilers and then in five poultry species (chicken, turkey, goose, duck, pigeon), focusing mainly on markers of EPEC pathotype and these strains characterization.

Altogether, 170 reference *E. coli* strains from National Food Chain Safety Office – Diagnostic Directorate, 114 broiler and 4 sewage (overall 288 *E. coli*) were tested. Atypical EPEC (atypical enteropathogenic *E. coli*) was the only pathotype identified among the isolates with an unexpected high frequency (28-30%). Majority of the aEPEC strains were multidrug-resistant (94 and 98%) against 15 clinically relevant antibiotics and shared a high serogroup diversity. They belonged to serogroups O14, O45, O108 and 25% of them grouped in the phylogenetic group B2. In summary, here we report the first aEPEC strains isolated from broilers in Hungary which were multiresistant and were isolated with high frequency.

Similar results were found by testing 319 *E. coli* strains from 45 chicken, 56 turkey, 89 duck, 105 goose and 37 pigeon. Samples contained only aEPEC strains, altogether in 7 cases (2 turkey, 2 goose, 3 pigeon). This low frequency of aEPEC was a possible consequence of collection from diverse age groups of poultry which served the investigation of a possible age related effect on aEPEC distribution. According to our results, young and adult poultry did not carry the aEPEC pathotype. It was found mainly in the growing (4-6 week old), sick (died) or stressed (eg.: force-feeding) birds. These aEPEC strains belonged to diverse serogroups comparing the poultry species and were multidrug-resistant except for isolates from pigeon. In summary, our research presented first the emergence of aEPEC in goose (*Anser anser domestica*) and its first detection in turkey and pigeon in Hungary. Furthermore, a possible effect of age dependence on the aEPEC frequency in poultry was suspected. The variability of sero- and phylogenetic groups of aEPEC strains among poultry species was also revealed.

4 Bevezetés

Az *Escherichia coli* baktériumot Theodor Escherich fedezte fel egészséges gyerekek székletében, 1885-ben (Escherich Theodor, 1886). A felfedezett baktériumot az előfordulása alapján előbb *Bacterium coli commune*-nak nevezte el, majd *Bacterium coli*-nak nevezte el, amely aztán a későbbi átsorolások alkalmával többször is megváltozott és végül is a ma is használatos *Escherichia coli* nevet kapta, tisztelegve annak első leírója előtt (Friedmann, 2014).

Az *E. coli* egy Gram-negatív az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, 1-2 μm nagyságú, pálcika alakú baktérium, amely számos csillóval rendelkezik, így aktív mozgásra képes. Az *E. coli* baktériumot morfológiai és biokémiai tulajdonságai alapján a többi *Enterobacteriaceae* családba tartozó törzsektől el lehet különíteni. A tenyésztés során laktóz bontásra képes, laktóz-pozitív törzsként viselkedik, gáz termelésre képes, azonban kén-hidrogént nem termel. Általában burkot nem képeznek, így nyálkás telepeket, mint a laktóz-pozitív *Klebsiella* és *Enterobacter* nemzetségbe tartozó fajok nem hoznak létre. A biokémiai reakciókban kataláz pozitív és oxidáz negatív törzsként viselkednek, ureázt nem termelnek, citrát hasznosítási próbában negatívak, viszont indol termelésük miatt az ennek kimutatására szolgáló próbában pozitívan viselkednek. (Quinn és mtsai., 2004)

Az *E. coli* baktériumot széles körben használják, hasznosítják. Így nem csak a kutatásokban alkalmazzák, mint jó modell törzs, hanem a gyógyszerek, enzimek és fehérjék előállításában is fontos szerepe van a gyógyszer és diagnosztikai iparban. A nagyfokú elterjedtségének és felhasználásának köszönhető az is, hogy elsőként állapították meg a teljes genom szekvenciáját ennek a prokariótának (Blattner és mtsai., 1997). Ez további lehetőségeket teremtett ennek a változékony baktériumnak a vizsgálataiban és laboratóriumi felhasználásban.

5 Irodalmi áttekintés

5.1 *Escherichia coli* előfordulása

Az *Escherichia coli* egy széles körben előforduló baktérium faj. A bélrendszer alsó szakaszának állandó tagja az emlősök és madarak esetében. Itt részt vesznek a normális bélflóra kialakításában, az esetleges patogén törzsek megtapadásának és túlszaporodásának megakadályozásában. Az *E. coli* a környezetben is gyakran előfordul, kikerülve a bélrendszerből az állatok által ürített bélsárral. Itt kedvező körülmények között akár hetekig, hónapokig is életben maradhatnak. Ennek köszönhetően az *E. coli* előszeretettel alkalmazott indikátor törzs a vizek és élelmiszerek esetében a bélsárral való érintkezés/kontamináció kimutatására.

A kommenzalista *E. coli* törzsek mellett azonban számos fakultatív patogén törzs is létezik, amelyek egészséges állatban nem, azonban újszülött és fiatal egyedekben, vagy az immunrendszer gyengülésével, társfertőzésekkel és a bélmikrobiótát illetve bélhámot, légutakat vagy húgyutakat károsító környezeti ártalmak révén bármely életkorban képesek elszaporodni és megbetegedéseket, fertőzéseket okozni. Ritka esetben léteznek obligát patogén *E. coli* törzsek is (EHEC), amelyek egészséges szervezetbe bejutva képesek megbetegedést okozni, súlyos, akár életet veszélyeztető állapotokat és akár járványokat is létrehozva (Varga és mtsai., 2018).

Az állatokban elsősorban a fakultatív patogén *E. coli* törzsek okoznak megbetegedéseket, amelyek hordozott virulencia faktoraik révén számos különböző szervrendszert képesek kolonizálni és ott jellegzetes károsító hatásukat kifejteni. Az is elmondható, hogy valamennyi emlős és madárfaj érzékeny az *E. coli* fertőzésekre, azonban az eltérő állatfajokat más és más patogenetikai tulajdonságokkal rendelkező *E. coli* törzs képes megbetegíteni. Ugyanis a hámsejtek (pl: bélhám- és húgyhámsejtek) eltérő felületi fehérjékkel (receptorokkal) rendelkeznek, melyeken különböző *E. coli* törzsek tudnak megtapadni (köszönhetően a különböző fimbriáknak és más adhezineknek) és a termelt általában toxinjaik révén a hámsejteket, illetve azok normális felszívó tevékenységét akadályozni. Ezzel is a felszívódást és az emésztési folyamatot megzavarják, így következményes hasmenést okoznak az állatokban és emberben egyaránt.

Az emberben megbetegedést okozó törzsek egy része környezeti, illetve állati eredetű. Így az állatokkal való közvetlen kapcsolat, valamint az élelmiszerek gyakori forrásai lehetnek emberi fertőzések kialakításában. Ezért a környezetben (pl: vízben) és élelmiszerekben kimutatott *E.*

coli minden esetben fontos veszélyforrását jelentheti az emberi fertőzéseknek, zoonózisok és esetlegesen járványok kialakulásának.

5.2 Patogén *Escherichia coli* törzsek besorolása

A kórokozó *E. coli* törzsek két fő csoportra oszthatók a szervezetben okozott megbetegedés helye szerint, úgy mint extraintesztinális *E. coli* (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) és intesztinális patogén *E. coli* (diarrheagenic *E. coli*, DEC). Az első kategória elsősorban agyhártyagyulladás és vérfertőzéssel (meningitis-associated *E. coli*, MNEC), valamint húgyúti fertőzéssel járó (uropathogenic *E. coli*, UPEC) problémákat okozó *E. coli* törzseket tartalmaz. Szintén ide tartoznak a madarakban számos megbetegedést okozni képes, széles körű virulenciafaktorokkal rendelkező madárpatógén *E. coli* (avian pathogenic *E. coli*, APEC) törzsek is (Kaper, 2005; Kathayat és mtsai., 2021).

Az intesztinális patogén *E. coli* törzsek további 7 csoportba sorolhatók be az általuk termelt fő virulencia faktorai és az általuk okozott bántalmak alapján, úgymint: enteropatógén *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), enterohemorragiás *E. coli* (enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC), enterotoxikus *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), enteroaggregatív *E. coli* (enteroaggregative *E. coli*, EAEC), enteroinvazív *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), diffúzan tapadó *E. coli* (diffusely adherent *E. coli*, DAEC) és tapadó-invazív *E. coli* (adherent-invasive *E. coli*, AIEC). Ez utóbbinak az emberi Crohn-betegségben tulajdonítanak újabban esetleges szerepet (Kaper, 2005).

5.3 *E. coli* törzsekben előforduló O-K-H-F antigének

Az *E. coli* törzsek elkülönítésében a szomatikus sejtfal O antigén mellett fontos szerep jut a baktérium felületi antigénjeinek, így a burok (K antigén), a csilló (H antigén) és a fimbria (F antigén) antigéneknek. Ezek közül is a legfontosabbak a hordozott O antigének, amelyek alapján 184 szerocsoportba, és a H antigének (54-féle), amivel együtt pedig szerotípusokba lehet besorolni az *E. coli* törzseket. Ezeket hagyományosan monovalens savókkal végzett agglutinációs próbákkal határozzák meg (Ørskov és Ørskov, 1984). Az utóbbi idők fejlesztéseinek eredményeképpen azonban létrehoztak már génszekvenciák alapján végrehajtott szerotipizálási módszereket is, ahol az O és H szerotípusra specifikus primerekkel és PCR reakcióval történik az egyes antigének kimutatása és ezek alapján az *E. coli* törzsek szerotípusba sorolása (Banjo és mtsai., 2018; Iguchi és mtsai., 2015). Ezen vizsgálatoknak fontos szerepe van a járványügyi nyomozásokban, állat-ember fertőzések összefüggéseinek megtalálásában. De egyes szerocsoportok jellegzetesek lehetnek akár egyes patotípusokra is (pl: O78:K80, O157:H7), amelyek akár súlyos, életet veszélyeztető fertőzéseket is képesek létrehozni.

5.4 *E. coli* patotípusok elkülönítése

Az egyes *E. coli* patotípusokat a megbetegítő-képességükben fontos szerepet játszó fő virulencia faktorok és az ezeket kódoló gének alapján jól elkülöníthetők egymástól. Így az *eae* az EPEC; *eae* és *stx* az EHEC; *aggR* az EAEC; *st* és *lt* az ETEC; *ipaH* az EIEC virulencia gének alapján, illetve a DEC esetében az *in vitro* szövettanyészeten létrehozott elváltozások alapján (Kaper, 2005; Lopes és mtsai., 2005). Bár, a többi patotípus esetében is jellegzetes kórszövettani elváltozásokat lehet kimutatni, de ezek meghatározása klinikai esetekben élő szervezetekben nem, vagy csak ritkán lehetséges. A molekuláris biológiai módszerekkel végzett vizsgálatok viszont gyorsabb és pontosabb kiértékelést tesznek lehetővé.

Az EPEC és EHEC törzsek esetében a gén szinten elvégzett vizsgálatok mindenképpen fontos részei a két patotípus elkülönítésében és részletes jellemzésének, köszönhetően a két patotípus közeli rokonságának. Számos kutatás bizonyítja, hogy az EPEC törzsek a Shiga toxin termelődését kódoló gént hordozó bakteriofágokkal való fertőződése révén jönnek létre az EHEC törzsek. (Tóth és mtsai., 2003) Így számos más virulencia gén azonos a két patotípusban, amelyek a patomechanizmusukban fontos szerepet játszanak.

5.5 EPEC és EHEC törzsek elkülönítése

Az enteropatogén *E. coli* (EPEC) klinikai megjelenése nagyban hasonlít az egyéb intesztinális *E. coli* okozta bántalmakra, amelyek az ember esetében, általában hasmenéssel járnak. Azonban az EPEC törzsek patomechanizmusa, bélhámsejtekre kifejtett hatása számos ponton eltér a többiekétől. Ebben fontos szerep jut a bélhámsejtek felületéhez való kapcsolódás módjának, mely az EPEC törzsek további károsító hatásának lényeges feltétele. Ebben vesz részt két kulcsfontosságú fehérje: a translocated intimin receptor (továbbiakban: tir, ahogy az ezt kódoló génszakaszt is nevezik) és az intimin (az ezt kódoló génszakasz neve: *eae*). Az EPEC törzsek a tir-t az ú.n. III-as típusú szekréción rendszer (type III secretion system - T3SS) segítségével juttatják a megtámadott gazdaszervezet bélhámsejtjeinek membránjába és teszik lehetővé a saját bakteriális sejtfaluk felületén lévő intimin fehérjéknek a tir-receptorokhoz való kihorgonyzását. Így, állandósult kapcsolatot hoznak létre a bélhámsejtekkel. A fenti két különböző funkciójú fehérjét és a szekréción rendszert kódoló génszakaszok, a bakteriális kromoszóma úgynevezett LEE (Locus of Enterocyte Effacement) patogenitási szigetén helyezkednek el több más, a patogenitásban ugyancsak fontos gén mellett. Ezen gének jól harmonizált együttműködése révén jön létre a jellegzetes bélmikrobaholy károsodás: „attaching/effacing” (A/E) lézió (Moon és mtsai., 1983). A szóban forgó gének kimutatása a kifejezetten rájuk tervezett primerekkel és a PCR (Polymerase Chain Reaction) felhasználása révén, könnyen megvalósítható. Ez az EPEC esetében a LEE-n

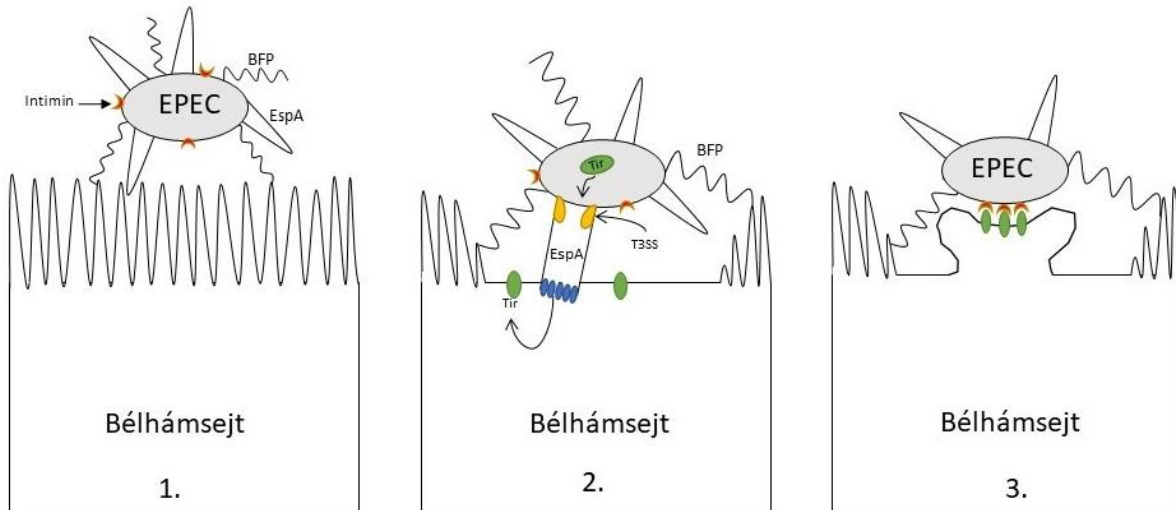
helyeződő *eae* (intimint kódoló) és a *tir* (tir fehérjét kódoló) génszakaszra tervezett specifikus primer párokkal lehetséges (China és mtsai., 1996).

A baktériumsejt kihorgonyzásban részt vevő intimin és tir azonban nem csak az EPEC törzsek megtapadásában vesznek részt. Jelenlétük az EHEC törzsekre is jellemző, melyek ugyanezen fehérjék (adhéziós virulencia faktorok) felhasználásával képesek a bélhámsejteken a tartós tapadást kialakítani. Az EPEC és EHEC törzsek elkülönítésében fontos tulajdonság az EHEC törzsek Shiga toxin (Stx) termelő képessége. Az EHEC törzsek által termelt Stx immunológia tulajdonságai és genetikai összetétele alapján két főbb típusra (Stx1 és Stx2) osztható. A Shiga toxin termelődéséért felelős *stx* gének profág (a baktérium DNS-ébe integrálódott fág) eredetűek és képesek bizonyos körülmények között mobilizálódni a bakteriális DNS-ből és más baktériumokba beépülni. (Kozłowska és mtsai., 2020) Az *stx1* és *stx2* konzervatív szekvenciára tervezett primerekkel, PCR segítségével kimutathatók ezen toxin termelődéséért felelős gének (China és mtsai., 1996). Ezzel, és az Stx toxinok esetleges *in vitro* kimutatásával, a mellett, hogy a klinikai kép a két patotípus (EPEC és EHEC) esetében rendszerint különbözik egymástól, a fenti két patotípus a molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével is jól elkülöníthető. A pontos diagnózisnak fontos szerepe van a megfelelő terápia kiválasztásában és az esetleges következmények mérlegelésében. EHEC fertőzés esetében ugyanis az antibiotikum terápia kontraindikált (az előtt baktériumokból eredő fokozott stx toxin felszabadulás a kórképet súlyosbíthatja), továbbá az EHEC törzsek súlyos és akár halálos megbetegedés okozói is lehetnek ember esetében, például a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) kiváltásával, amely általában állati eredetű élelmiszer okozta bántalomnak tekinthető (Nguyen és mtsai., 2012).

5.6 Az enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC)

Az enteropatogén *Escherichia coli* a hasmenéssel járó megbetegedések nagy részében világszerte előfordul, mint kóroki tényező: az évente előforduló kb. 800.000 hasmenéses eset miatti elhalálozásban is fontos szerep jut az EPEC-nek, legfőképpen a fiatal korosztály, így a gyerekek esetében (Hernandes és mtsai., 2009; Hu és Torres, 2015). A megbetegedés során az EPEC törzsek a vékonybélben a már említett, jellegzetes, "attaching-effacing" (A/E) léziót hozzák létre, melynek során a bélmikrobolyhok eltűnnek és a bélhámsejt membránján a baktérium kapcsolódásának a helyén dobogószerű felemelkedés jön létre. Ez egy háromlépcsős modell alapján, három fázisban valósul meg: helyi megtapadás (local adherence), jelátvitel (signal transduction) és tartós megtapadás (intimate adherence) (Nataro és Kaper, 1998). Az előzetes helyi megtapadás a tipikus EPEC (tEPEC) esetében az EAF plazmidon lévő *bfpA* gén által kódolt pilus révén jön létre. Míg ez az atipikus EPEC (aEPEC) esetében más és változatos, jórészt még ismeretlen adhezineknek köszönhető. A jelátvitel

során a LEE (Locus of Enterocyte Effacement) patogenitási szigeten kódolt III-as típusú szekréción rendszernek, az EPEC által kiválasztott fehérjéknek (EspA, EspB, EspD) és a tir-nek van nagy jelentősége, ami az utolsó lépcsőben, a szintén a LEE-n kódolt intimin (*eae*) számára megteremt a bélhámsejtek felületén való megtapadásnak és a baktérium állandósult rögzülésének a lehetőségét (Hernandes és mtsai., 2009). (1. ábra) Ez utóbbi lépés (tir és intimin kapcsolódás) tekintetében a tEPEC és aEPEC törzsek nem különböznek.



1. ábra Az EPEC törzsek bélhámsejtekhez való kapcsolódásának három fázisa.

(1. Helyi megtapadás a BFP pilusok segítségével., 2. Jelátvitel és a III-típusú szekréción rendszer fehérjéinek (pl. EspA) szerepe a transzlokált intimin receptor (Tir) átadásában és a bélmikrobolyhok elhajlításában. 3. Szoros kapcsolat a gazdasejt és a baktérium (tir és intimin) között, a bélhámsejt membránjának egyidejű megemelkedésével (AE lézió))

Az EPEC sejthártya és bélmikrobolyh károsító hatásai miatt a béltartalom és a bélnyálkahártya sejtjei közötti anyagforgalom és a felszívódás zavart szenved. A bélmikrobolyhok számának csökkenése miatt csökken a bél felszívó felülete, mely károsító hatások következménye hasmenéses tünetekben fog nyilvánulni.

A tipikus és atipikus EPEC törzseknek eltérő járványtani jellemzőik vannak és eltérő súlyosságú megbetegedéseket okozhatnak, s egy-egy földrajzi területen hasmenéses és beteg gyermekekben, enteroaggregatív *E. coli* (EAEC) törzsekkel vegyesen is előfordulhatnak (Dow és mtsai., 2006).

5.7 A tipikus enteropatogén *Escherichia coli* (tEPEC)

A tEPEC csak emberben okoz megbetegedést. Jelen ismereteink szerint állatokban nagyon ritkán mutatható ki és nem okoz megbetegedést. Ennek megfelelően a tEPEC hordozásában az ember játssza a főszerepet és az ember a fő fertőzési forrás is (Nataro és Kaper, 1998). A

tEPEC törzsek leggyakrabban az O55, O86, O111, O114, O119, O127, O142 szerocsoportokba tartoznak (Trabulsi és mtsai., 2002). Azonban állatokból is esetenként kimutatható a tEPEC, mint szennyező/kontamináns flóra, ez is leginkább állati termékek esetében, vagy emberrel szoros kontaktusban lévő társállatokból, mint kutya és macska (Abri és mtsai., 2019; Arais és mtsai., 2018; Goffaux és mtsai., 2000; Rodrigues és mtsai., 2004). A tEPEC állategészségügyi jelentősége ezért csekély, inkább az egészségügy számára fontos az összefüggések felderítése. A fentiek alól kivételt képeznek a szopós és választott nyulak EPEC törzsei (l: alább). Míg az elmúlt évszázad végéig az *E. coli* okozta emberi hasmenéses esetek leginkább a tEPEC törzsekkel voltak összefüggésben, addig az 1990-es évektől kezdődően a tEPEC okozta fertőzések száma drasztikusan csökkent, vélhetően a javuló életkörülményeknek és higiéniai feltételeknek köszönhetően. Így ettől kezdve az aEPEC okozta hasmenéses esetek és járványok kerültek inkább előtérbe (Trabulsi és mtsai., 2002).

A szopós és választási korú nyulakban súlyos hasmenést és elhullást okozó és ezért komoly állategészségügyi jelentőségű EPEC törzsekről az utóbbi évtizedekben számos új megfigyelés került napvilágra. Jelen ismeretek szerint a nyúl az egyetlen háziállat, melyben az EPEC (elsősorban az O15, O26, O103, O132 szerocsoportba tartozó) baktériumok természetes körülmények között súlyos megbetegedést okoznak (Milon és mtsai., 1999). A kórfolyamat a humán tEPEC törzseknél leírtakkal azonos, mivel a nyúl EPEC törzsek is rendelkeznek a bélmikrobolyhokhoz való előzetes adhéziót segítő pilusokkal (AF/R1, AF/R2 és Ral), melyek közül az AF/R2 a kromoszómán, míg a másik kettő, a humán EPEC törzsek BFP pilusaihoz hasonlóan, plazmidon kódolt virulenciafaktor (Adams és mtsai., 1997; Fiederling és mtsai., 1997; Krejany és mtsai., 2000).

Ezekon kívül számolnunk kell további szerocsoportok (pl. O153, O157) és eddig ismeretlen adhéziós pilusok szerepével is (Dow és mtsai., 2005).

5.8 Az atipikus enteropatogén *Escherichia coli* (aEPEC)

Az aEPEC mind az ember, mind az állatok szempontjából fontos alcsoportnak számít, gyakran csupán tünetmentes baktérium hordozással jár, bár klinikai jelentőségét a humán megbetegedések esetében gyakrabban észlelik.

Emberben az aEPEC, a tEPEC törzsekhez hasonlóan, szintén képes hasmenéssel járó megbetegedést okozni. Sőt az 1990-es évektől a tEPEC okozta megbetegedések gyakorisága csökkent és helyette az aEPEC okozta hasmenések fordulnak elő inkább. A legnépesebb földrészeken (Afrika, Ázsia, Dél-Amerika) a gyerekek esetében a leggyakoribb és halált okozó megbetegedések közé a hasmenéses kórképek tartoznak, melyek hátterében földrészenként

eltérő okok lelhetők fel. A fejlődő világban és így a legnépesebb országokban az *E. coli* okozta hasmenések vannak az első helyen (Zhou és mtsai., 2018). Ezen szerzők azt is kimutatták, hogy a hasmenést okozó *E. coli* törzsek döntő többségét az EPEC (50%) és ezen belül is az aEPEC (77,8%) adja. Azonban az aEPEC nem csak a fejlődő világban (Brazília, Mexikó, Vietnám, stb.), hanem a fejlett világban (USA, Németország, Finnország, Norvégia, Japán, stb.) felnőttekben is okoz időszakosan járványos megbetegedéseket (Hernandes és mtsai., 2009; Kinnula és mtsai., 2018), vagy egyes krónikus hasmenéses esetekben is nagy számban fordul elő (Hu és Torres, 2015).

Az aEPEC törzseket mind akut, mind krónikus hasmenéses emberi megbetegedésekből gyakran izolálják, azonban az aEPEC egyedüli kóroki szerepét a hasmenések kiváltásában még nem sikerült bizonyítani. E kérdés még vitatott és egyre többet vizsgált a kórtani szerepe az aEPEC törzseknek (Hu és Torres, 2015). Az emberi megbetegedésekben betöltött szerepét illető, és jelenleg még hiányzó információk miatt ezen patotípus előfordulásáról és epidemiológiájáról egyre növekvő számú adat áll rendelkezésünkre.

Állatok esetében az EPEC törzsek molekuláris genetikai módszerekkel való tanulmányozása, valamint az emberi aEPEC megbetegedések előfordulásának előretörése ugyancsak egyre több adatot generál. Jelenlegi ismereteink szerint, minden fontosabb haszonállat, társállat, de még a vadállatok is gyakran hordoznak a béltraktusukban aEPEC törzseket, akár betegség tünetei nélkül. Így például szarvasmarhában, juhban, sertésben, lóban, szarvasban, házi tyúkban, pulykában, kutyában, macskában, vadmadarakban is leírták már az aEPEC törzseket (Malik és mtsai., 2006; Hernandes és mtsai., 2009; Pakpinyo és mtsai., 2002; Saidenberg és mtsai., 2017). Az állatok tehát fontos rezervoárijai lehetnek az aEPEC törzseknek.

A **társállatok**, mint az emberrel szoros kapcsolatban lévő állatfajok, könnyen lehetnek az emberi fertőzés forrásai is. Brazíliában pl. a kutyák bélsarában jelenlévő aEPEC törzseket összehasonlítva a hasmenéssel küzdő gyerekekben izolált *E. coli* törzsekkel, több esetben is találtak hasonlóságot szerocsoportok és virulenciafaktorok tekintetében is, amiből azt a konklúziót vonták le, hogy egyes esetekben a kutyák a fertőzés forrásai, illetve rezervoárijai lehetnek az emberben kialakuló *E. coli* okozta hasmenéseknek (Arais és mtsai., 2018; Puño-Sarmiento és mtsai., 2013). Ecuadorban végzett felmérés alapján is azt találták, hogy a társállatokból és háziállatokból izolált aEPEC törzsek összefüggésbe hozhatók az emberben betegséget okozó törzsekkel (Vasco és mtsai., 2016). Ezek a vizsgálatok fontosak lehetnek a társállatok etetése során a fejlett világban reneszánszát élő BARF (Csont és nyers étel - Bones and raw food) és egyéb táplálási elgondolások mikrobiológiai és járványügyi megítélésében

és az esetleges zoonotikus veszélyek mérlegelésében is (Bottari és mtsai., 2020; Treier és mtsai., 2021).

Macskák hasmenéses megbetegedései esetében is az aEPEC baktériumok kórokozó hatása volt kimutatható. Néhány hetes kismacskákban előforduló hasmenéseknél szignifikáns különbséget találtak a beteg és a hasmenéses macskák aEPEC hordozásában és a hasmenés súlyosságában, valamint annak kimenetele között (Watson és mtsai., 2017). Az aEPEC okozta megbetegedés okait vizsgálva arra jutottak, hogy az antibiotikummal kiváltott bélfőra-eltolódás hatására a kísérletesen fertőzött állatokban kiváltható lett a hasmenés, míg az egészséges bélfőrával rendelkező, vagy probiotikumot kapó egyedek védettebbek lettek az aEPEC hatásai ellen (Watson és mtsai., 2019). További megállapításai ennek a kutatócsoportnak, hogy a macskákban előforduló aEPEC törzsek nem különböztek jelentősen az emberi megbetegedést okozó törzsektől és így a macskák fontos forrásai lehetnek zoonotikus fertőzéseknek is (Watson és mtsai., 2020).

Kutyák esetében számos információval rendelkezünk arról, hogy gyakori az aEPEC törzs hordozásuk és forrásai lehetnek szintén emberi megbetegedéseknek (Arais és mtsai., 2018; Puño-Sarmiento és mtsai., 2013; Vasco és mtsai., 2016). A klinikai eseteket elemezve hasmenéses kutyák esetében is gyakran fordul elő az aEPEC, melynek jelenléte befolyásolja a hasmenés súlyosságát és annak kimenetelét, hasonlóan a macskákhoz (Drolet és mtsai., 1994; Kjaergaard és mtsai., 2016; Sancak és mtsai., 2004).

A **haszonállatok esetében** az aEPEC hordozás viszonylag gyakori. Baromfi vágás esetében pl. a béltartalom rendszeres kenődése a vágott testeken nagy esélyét adja annak, hogy az ember fertőzési forrásai legyenek (Alonso és mtsai., 2011). Ezek a törzsek számos esetben hordozhatnak olyan változatos virulencia géneket, melyek emberi megbetegedés kapcsán is fontosak lehetnek (Comery és mtsai., 2013; Moura és mtsai., 2009). Az aEPEC törzsek e mellett számos antibiotikum rezisztencia gént is hordoznak, ami bizonyítja az aEPEC nagyfokú variabilitását (Hernandes és mtsai., 2009; Xu és mtsai., 2017). Ezek lehetőséget adhatnak az aEPEC törzseknek betegségek előidézésében vagy más baktériumok és vírusok által kiváltott bántalmak súlyosbításában, de szerepük lehet virulencia és antibiotikum rezisztencia gének hordozásában és továbbadásában is (Szmolka és mtsai., 2012; Malik és mtsai., 2017).

A baromfi fajok közül a pulyka bélgyulladás és malabszorpcióval járó megbetegedése kapcsán (PEMS – Poultry enteritis and malabsorption syndrome) is felmerült a jelentősége az aEPEC törzseknek, több más kórokozó (pl.: corona- és rotavírus) egyidejű károsító hatása mellett (Saidenberg és mtsai., 2017). Amint azt kísérletesen is sikerült igazolni, a pulyka

coronavírus lehetőséget teremt az aEPEC kolonizációjának. Az aEPEC kísérleti társfertőzés a koronavírus okozta hasmenés súlyosságát és annak kimenetelét szignifikánsan befolyásolta, így a testtömeg csökkenés és felszívódási zavar mellett kísérletesen nagyfokú elhullás volt kimutatható (Guy és mtsai., 2000; Pakpinyo és mtsai., 2003).

Az aEPEC emlős haszonállatokból is rendszeresen izolálható, azonban a szarvasmarha (és borjú) esetében az EHEC (illetve ETEC), a sertés esetében pedig az ETEC fertőzés lehet sokkal nagyobb klinikai jelentőségű, melyek közül az EHEC komoly emberi megbetegedések okozója lehet (Dubreuil és mtsai., 2016; Nagy és Fekete, 2005; Persad és Jeffrey, 2014; Varga és mtsai., 2018).

A sertések aEPEC fertőzéseit illetően elsősorban kanadai vizsgálatok igazolták, hogy választási malacok hasmenéses eseteiből izolált aEPEC törzsek néhány jól meghatározott szerocsoportba (pl.: O26, O45, O108, O141) tartoznak, melyek jelentős része az un. sertés adhéziós fehérje génjét (*paa*) is hordozza (Helie és mtsai., 1991; Zhu és mtsai., 1995). Hazai vizsgálatok e mellett a β -intimin és *paa* hordozó O23:H11 típusú törzsek dominanciájára és fokozott kórtani szerepére, valamint a hajlamosító tényezők (pl. szója etetés, ETEC társfertőzés) jelentőségére hívták fel a figyelmet (Malik és mtsai., 2006; Malik és mtsai., 2012). A sertés aEPEC törzsek elsődleges patogenitását és közvetlen zoonotikus jelentőségét illetően mindkét kutatócsoport negatív előjelű következtetésekre jutott.

Bárányokban az életkor előrehaladásával az aEPEC előfordulása csökken, így felnőttkori előfordulásuk ritka (Martins és mtsai., 2016). Norvégiai kutatók szerint egyes juh állományokban és emberekben, azonos molekuláris mintázatú O26:H11 szerotípusú EHEC-, és EHEC-szerű törzsek jelentős gyakorisággal fordultak elő. E mellett a juh izolátumok harmada O26:H11-es aEPEC törzsnek bizonyult, de ilyenek a humán törzsek között nem voltak. Ennek alapján gyanítják, hogy egyes EHEC-szerű O26-os törzsek az *stx* hordozó bakteriofág felvételével zoonotikus jelentőségre tehetnek szert (Brandal és mtsai., 2012; Sekse és mtsai., 2011). Ez utóbbi lehetőséget egyébként, hazai kutatók korábban egy sertés eredetű aEPEC, O45-ös törzs, *stx2*-fág *in vivo* transzdukciójával igazolták (Tóth és mtsai., 2003).

6 Célkitűzések

Az állatokban előforduló EPEC és főként aEPEC törzsek magyarországi gyakoriságát illetően kevés adattal rendelkezünk. Baromfifélék esetében pedig elmondható, hogy kutatásunkat megelőzően ilyen irányú vizsgálatok vagy adatok nem voltak.

Ezért célul tűztük ki, hogy a főbb haszonállatként tartott baromfifélék (házi tyúk, pulyka, kacsa, lúd, galamb) esetében megvizsgáljuk az előforduló enterális *E. coli* patotípusokat, hogy a kapott eredményeink alapján további megállapításokkal gyarapítsuk a baromfival kapcsolatos ismereteket.

Így az alábbi célokat tűztük ki a PhD munkám során:

1. A házi tyúk esetében megvizsgálni, adatot gyűjteni a hordozott *E. coli* patotípusokról saját gyűjtésű mintákon és referencia törzsgyűjteményen.
2. A feltételezhetően enterális patogén *E. coli* törzsek fenotípusát (antibiotikum rezisztenciáját és szerocsoportját), valamint filogenetikai hovatartozását meghatározni.
3. Az azonosított potenciális kórokozók rezisztencia vizsgálatával célunk volt meghatározni a törzsek antibiotikum rezisztencia hordozását és elterjedtségét.
4. Az öt leggyakrabban tartott baromfi faj esetében összehasonlító vizsgálatot végezni a hordozott enterális *E. coli* patotípusokkal kapcsolatosan, külön hangsúlyt fektetve az esetleges életkori különbözőségekre.

Elsőként brojlercsirke kapcsán végeztünk vizsgálatot, aminek során multirezisztens atipikus enteropatogén *E. coli* törzseket izoláltunk elsőként Magyarországon brojlerekből.

Ezt követően a további öt baromfi faj esetében végeztünk összehasonlítást, különös hangsúllyal az életkori eltérésekre, aminek eredményeképpen megtehettük az első aEPEC leírását ludakból, valamint az első haza aEPEC leírását pulykából és galambból.

7 Multirezisztens aEPEC törzsek izolálása brojlerekből

7.1 Anyagok és módszerek

7.1.1 Mintagyűjtés és *E. coli* izolálás

Összesen 118 *E. coli* törzset gyűjtöttünk 2016 (n=22) és 2017-ben (n=96) egy budapesti baromfi vágóhídon. A levágásra kerülő brojlereket egy saját telepen nevelték fel és szállították ide. Betegség tüneteit sem vágás előtt, sem utána nem mutatta egyik madár sem. A mintákat három területről gyűjtöttük össze. A teljes béltraktus eltávolítását követően a vakbelekből aseptikus körülmények között steril vatta tamponnal 57 mintát vettünk. Majd a már vágást követően lehűtött brojlerek belső testfelületéről is steril tamponnal 57 mintát gyűjtöttünk. Ez utóbbiak eltérő állatokból származtak, mint a vakbél minták. A fennmaradó 4 mintát a vágóhídról mechanikai szűrésen átesett és később a csatornahálózatba engedett szennyvízből nyertük, minden esetben 2 ml mennyiséget. A gyűjtött mintákat 4 °C fokon tároltuk legfeljebb 2 óra hosszat a laboratóriumi mintafeldolgozást megelőzően.

A gyűjtött mintákat brómtimol-kék táptalaj felületére szélesztettük el és 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk őket. Ezt követően minden táptalaj felületéről egy laktóz pozitív telepet tovább szélesztettünk, amíg morfológiailag egységes szintenyészetet nem kaptunk. Az így nyert törzseket MALDI-TOF tömegspektroszkópai eljárás segítségével *E. coli* törzseknek igazoltuk. Az így nyert *E. coli* szintenyészeteket 15% glicerinnel hozzáadását követően -80 °C-on tároltuk tovább (Biswas és mtsai., 2013; Paauw és mtsai., 2015).

A baromfi eredetű *E. coli* törzsek további részét a Nébih-ÁDI bakteriológiai laborjából kaptuk meg kutatási célokra. A kapott 170 törzset 16 vágóhídon gyűjtötték, ezzel 113 brojler előállító telepet reprezentálva 2017-ben, mint *E. coli* referencia törzs gyűjtemény.

7.1.2 Fenotípusos vizsgálatok (antibiotikum rezisztencia és szerotípus)

A patotípusba sorolt saját gyűjtésű *E. coli* törzsek szerotípusa az Országos Epidemiológiai Intézetben Ørskov és Ørskov (1984) által leírt módszer alapján O antigén specifikus savók felhasználásával került meghatározásra.

Az antibiotikum rezisztenciát korong diffúziós módszerrel határoztuk meg, ATCC 25922 *E. coli* referencia törzs alkalmazása mellett. A rezisztencia vizsgálatot röviden az alábbi módon végeztük el: a vizsgált baktérium 0,5 McFarland sűrűségű levestenyészetéből 100 µl-t Mueller-Hinton agar felületére egyenletesen elszélesztettük, majd a lemezek száradását követően

(baktériumok kitapadása után) 7-8 antibiotikum korongot helyeztünk el egyenletesen a lemez felületére. A 24 órás 37 °C-os inkubálást követően leolvastuk a kialakult gátlási zónák átmérőjét. Ezt a CLSI (2015) értékelési szempontjai alapján soroltuk be érzékeny és rezisztens csoportokba. Összesen 10 csoportba tartozó, 15 antibiotikumot vizsgáltunk meg. (1. táblázat)

A transzferábilis kolisztin rezisztencia gén meglétét a Liu és mtsai. által az *mcr-1* génre leírt primer párral végeztük el az *E. coli* törzseken. (lásd 3. táblázat)

1. táblázat Antibiotikum rezisztencia tesztben alkalmazott antibiotikumok és azok koncentrációi.

Hatóanyag csoport	Antibiotikum neve (koncentrációja)
β-laktámok	ampicillin (10 µg)
	amoxicillin (10 µg)
Cefalosporinok	cefotaxim (30 µg)
Aminoglikozidok	gentamicin (10 µg)
	kanamicin (30 µg)
	sztreptomycin (10 µg)
Tetraciklinek	tetraciklin (30 µg)
Fluorokinolonok	ciprofloxacin (5 µg)
	enrofloxacin (5 µg)
Kinolonok	nalidixsav (30 µg)
Folsav inhibitorok	trimetoprim (30 µg)
	szulfometoxazol (300 µg)
	trimetoprim + szulfometoxazol (1,25 µg/23,75 µg)
Fenikolok	klóramfenikol (30 µg)
Nitrofuránok	nitrofurantoin (300 µg)

7.1.3 Molekuláris genetikai vizsgálatok

A molekuláris vizsgálatokhoz szükséges DNS templátot forralásos módszerrel állítottuk elő. Minden *E. coli* izolátumot 2 ml LB levesbe oltottunk be és 24 órát 37 °C-on tenyésztettük. A vizsgált törzsek 500 µl levestenyészetet 12.000 rpm (round per minutes/fordulat per perc) fordulat mellett lecentrifugáltunk, a felülúszót leöntöttük és a baktérium üledéket 200 µl steril desztillált vízben feloldottunk. A baktérium szuszpenziót 96 °C-on 10 percig „forraltuk”, majd újabb centrifugálást követően (12.000 rpm – 5 másodperc) a felülúszóból 50 µl-t használtunk továbbiakban templátként. A templátokat mínusz 20 °C-on tároltuk felhasználásukig.

Az *E. coli* izolátumokban előforduló patotípus specifikus virulencia faktorokat a már máshol korábban publikált primerek segítségével és a 2. táblázatban közölt referencia törzseket használva, mint pozitív kontrol, PCR-rel vizsgáltuk meg. A PCR master mixet a DreamTaq® DNS polimerázból (Thermo Scientific) és a hozzá tartozó puffer segítségével a gyártói utasítás alapján állítottuk elő, amely 0,5 µM primert tartalmazott minden reakcióban. A primerek részletes adatait és hivatkozásait a 3. táblázatban foglaltuk össze. A LEE (Locus of enterocyte effacement) patogenitási szigetet irányító (regulator) *ler* gént kimutatni képes primert a jelen munkánk során a primer-BLAST (National Center of Biotechnology Information, U.S. National Library Medicine) segítségével terveztük meg. A *ler* specifikus PCR termék kalkulált hossza 172 bp (bázis pár). A *ler* génre irányuló PCR vizsgálatokban 60 °C-os olvadási hőmérsékletet alkalmaztunk.

2. táblázat PCR reakciókban alkalmazott pozitív referencia törzsek

Patotípus	Alkalmazott <i>E. coli</i> referencia törzs	Referencia
EPEC	E2348/69	China és mtsai., 1999
EHEC	<i>E. coli</i> O157:H7 Sakai	Hayashi és mtsai., 2001
ETEC	E2173	Fekete és mtsai., 2003
EAEC	E659	Dow és mtsai., 2006
EIEC	E812	Tóth és mtsai., 2016

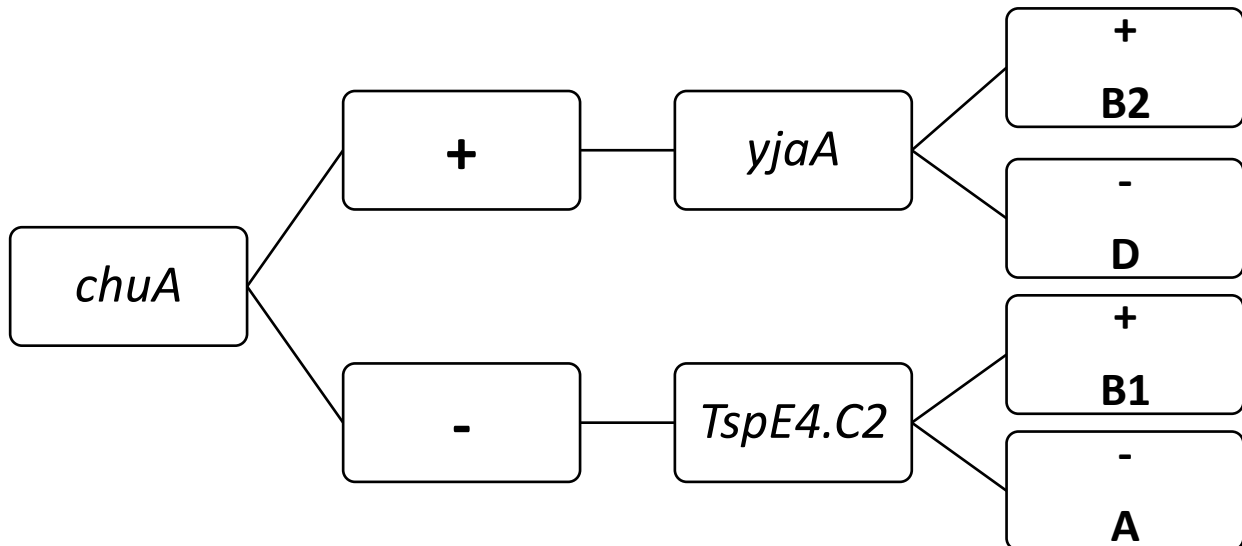
A PCR során kapott amplikonokat gélelektroforézissel (1,5%-os gélben) választottuk el egymástól (konstans 110 Voltos feszültség mellett) átlagosan 30 perces futtatási idő alatt. Minden gélelektroforézis során pozitív kontrollt (olyan amplikon, ami a keresett gént tartalmazza) és negatív kontrollt (minta nélküli PCR master mix) is alkalmaztunk, 100 bp marker (Invitrogen®) alkalmazása mellett. A gélben megjelenő amplikonokat, etídium-bromiddal való festést követően, UV fényvel tettük láthatóvá és fényképezőgéppel dokumentáltuk.

3. táblázat PCR-ben alkalmazott primerek szekvenciái és referenciái.

Vizsgált gén	Primer neve, szekvenciája (5'-3')	Referencia
<i>eae</i>	B52: AGGCTTCGTCACAGTTG B53: CCATCGTCACCAGAGGA	China és mtsai., 1996
<i>stx 1</i>	B54: AGAGCGATGTTACGGTTTG B55: TTGCCCCCAGAGTGGATG	China és mtsai., 1996
<i>stx 2</i>	B56: TGGGTTTTTCTTCGGTATC B57: GACATTCTGGTTGACTCTCTT	China és mtsai., 1996
<i>sta</i>	STa-F: TTTATTTCTGTATTGTCTTT STa-R: ATTACAACACAGTTCACAG	Rajkhowa és mtsai., 2009
<i>lt1</i>	LT1-F: AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA LT1-R: GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	Rajkhowa és mtsai., 2009
<i>ipaH</i>	IPAH III: GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC IPAH IV: GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	Echeverria és mtsai., 1993
<i>aggR</i>	aggR-3: CATCTCTTTGATAAGTCCTTCTCG aggRks-1: GTATACACAAAAGAAGGAAGC	Kimata és mtsai., 2005
<i>bfpA</i>	EP1: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC EP2: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	Gunzburg és mtsai., 1995
<i>eaf</i>	Eaf1: CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA Eaf2: TATGGGGACCATGTATTATCA	Franke és mtsai., 1994
<i>perA</i>	K1693: CCCAAGCTTTGGCAATGTTCTTGTGT perA-24F: AACAAACGCGCATGAAGGTG	Teixeira és mtsai., 2015
<i>tir</i>	tirY474-F: CATATTTATGATGAGGTCGCTC tirS478-F: TCTGTTCAGAATATGGGGAATA tirR: TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT	Fröhlicher és mtsai., 2008
<i>ler</i>	ler-fw: GACCAGGTCTGCCCTTCTTC ler-rev: GACTGCGAGAGCAGGAAGTT	saját tervezés ^a
<i>mcr1</i>	CLR5F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC CLR5R: CTTGGTTCGGTCTGTAGGG	Liu és mtsai., 2016
<i>ChuA</i>	ChuA.1: GACGAACCAACGGTCAGGATACGGTCAGGAT ChuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Clermont és mtsai., 2000
<i>YjaA</i>	YjaA.1: TGAAGTGTCAGGAGACGCTG YjaA.2: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	Clermont és mtsai., 2000
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1: GAGTAATGTCTGGGGCATTCA TspE4C2.2: CGCGCCAACAAAGTATTACG	Clermont és mtsai., 2000

^a BLAST (National Center of Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) tervező programot felhasználva, pozitív és negatív törzsekkel hitelesítve

A filogenetikai besorolását az *E. coli* törzseknek a Clermont és mtsai. (2000) által leírt multiplex PCR vizsgálattal végeztük el a három génszakaszra tervezett primer (*ChuA*, *YjaA*, *TspE4C2*) és az általuk megalkotott döntésfa alapján. (2. ábra)



2. ábra Döntési fa a filogenetikai csoportok meghatározására, a Clermont és mtsai. (2000) által megalkotott triplex PCR (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*) eredményei alapján.

7.1.4 Statisztikai elemzés

Az eredményként kapott gyakorisági értékek esetében a 95%-os konfidencia intervallumot és várt gyakoriságot az EpiTools (EpiTools epidemiological calculators, 2019) segítségével állapítottuk meg. A gyakorisági értékek összehasonlítását a Fisher-egzakt teszttel (95%-os konfidencia intervallummal) az R statisztikai programban (R Core Team, 2020) hajtottuk végre.

7.2 Eredmények

7.2.1 Izolált baktériumok és molekuláris genetikai vizsgálatok

A munkánk során összesen 118 *E. coli* törzset izoláltunk 114 baromfiból és 4 vágóhídi szennyvízből származó mintából. Az izolátumok fajmeghatározását MALDI-TOF segítségével végeztük el. Az így kialakított *E. coli* törzskollekciót tagjait PCR módszerrel vizsgáltuk meg az esetlegesen előforduló humán intesztinális patogén csoportok virulencia marker génjeire. Ezen a gének a következők voltak: *eae* (EPEC); *eae* és *stx* (EHEC); *aggR* (EAEC); *st* és *lt* (ETEC) és *ipaH* (EIEC). A PCR vizsgálatok eredményeként 83 *eae* pozitív törzset azonosítottunk. A vágóhídról 35 törzs (29,7%, 95% CI: 22,2–38,4%) és a Nébih-ÁDI törzskollekcióból 48 törzs (28,2%, 95% CI: 22,0–35,4%) hordozott *eae* gént. A vágóhídi *eae* pozitív minták közül 18 a vakbélből (n=57), 16 a vágott testekből (n=57) és 1 a szennyvízmintákból (n=4) származott. A kollekciónkban egyéb patogén specifikus génszakaszt nem sikerült kimutatni. Jellemeztük az azonosított EPEC törzseket és megállapítottuk, hogy mind hordozzák a patogenezisben fontos szerepet játszó *tir* és *ler* gént (Fröhlicher és mtsai., 2008) is, viszont egyik általunk azonosított EPEC sem rendelkezett a tipikus EPEC törzsekre jellemző EAF plazmid kódolta *perA* regulátor (Mellies és mtsai., 2011) és *bfp* génekkel (Trabulsi és mtsai., 2002). Ennek alapján az EPEC törzseinket atipikus EPEC törzseknek azonosítottuk be.

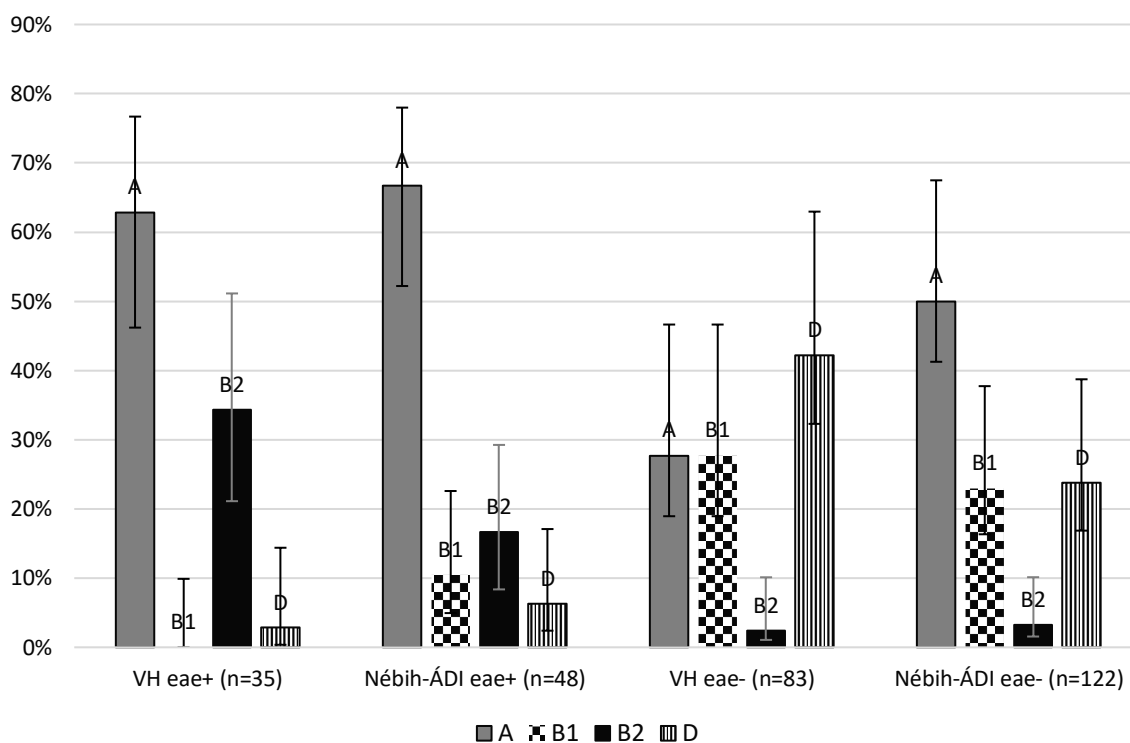
Vizsgálva a törzsek legfőbb filogenetikai csoportokba való tartozását a nem EPEC és aEPEC törzsek filogenetikai összetétele lényeges eltérést mutatott.

Így a **vágóhídi nem EPEC törzsek** (n=83) az A (28%, 95% CI: 19,2–38,2%), B1(28%, 95% CI: 19,2–38,2%), B2 (2%, 95% CI: 0,7–8,4%) és D (42%, 95% CI: 32,1–52,9%) filogenetikai csoportba

és A (63%, 95% CI: 46,3–76,8%), B1 (0%, 95% CI: 0,0–9,9%), B2 (34%, 95% CI: 20,8–50,9%), D (3%, 95% CI: 0,5–14,5%) filogenetikai csoportba tartoztak **az aEPEC törzsek** (n=35) esetében.

A **Nébih-ÁDI**-ből származó minták esetében a **nem EPEC** törzsek (n=122) A (50%, 95% CI:41,3–58,7%), B1 (23%, 95% CI: 16,4–31,2%), B2 (3%, 95%CI: 1,3–8,1%), D (24%, 95% CI: 17,1–32,1%) filogenetikai csoportba

és A (67%, 95% CI:52,5–78,3%), B1 (10%, 95% CI: 4,5–22,2%), B2 (17%, 95%CI: 8,7–29,6%) és D (6%, 95% CI: 2,2–16,8%) filogenetikai csoportba tartoztak **az aEPEC törzsek** (n=48) esetében. (3. ábra)



3. ábra Filogenetikai csoportok megoszlása a vágóhídi (VH) és Nébih-ÁDI aEPEC és nem EPEC törzsek esetében. (A, B1, B2, D: filogenetikai csoportok)

Összehasonlítva a filogenetikai csoportokat a nem EPEC és aEPEC törzsek esetében szignifikáns különbséget ($p \leq 0.05$) találtunk Fisher egzakt teszttel, kivéve a B1 és D csoportok összehasonlításában. Ez utóbbi két csoport esetében, a két filogenetikai csoport számított gyakorisági értékeinek közelsége miatt nem bizonyult szignifikánsnak a Fisher egzakt teszttel végzett számítás. A statisztikai elemzés is azt mutatta, hogy az *E. coli* patotípusa befolyásolja a filogenetikai csoportok gyakorisági értékeit.

7.2.2 Szerocsoportok az aEPEC esetében

Meghatároztuk az általunk gyűjtött és azonosított aEPEC törzsek szerocsoportjait. Az aEPEC törzsek változatos szerocsoportokba tartoztak, nevezetesen O14, O45 és O108. A 2016-ban gyűjtött minták esetében az O108 mutatkozott dominánsnak (10 minta a 13 aEPEC törzsből), valamint egy vágott testből származó aEPEC O14-es szerocsoportúnak bizonyult és kettő izolátum szerocsoportja nem volt meghatározható az O antigénjeik alapján. A 2017-ben gyűjtött mintáknál viszont az O14-es szerocsoport volt a domináns (20 minta a 22 aEPEC törzsből), egy O45-nek (szennyvízből származó) bizonyult és egy törzs nem volt besorolható az O antigénje alapján (4. táblázat).

4. táblázat A 2016 és 2017-ben gyűjtött aEPEC törzsek eredete, filogenetikai-, szerocsoportjai és antibiotikum rezisztenciája.

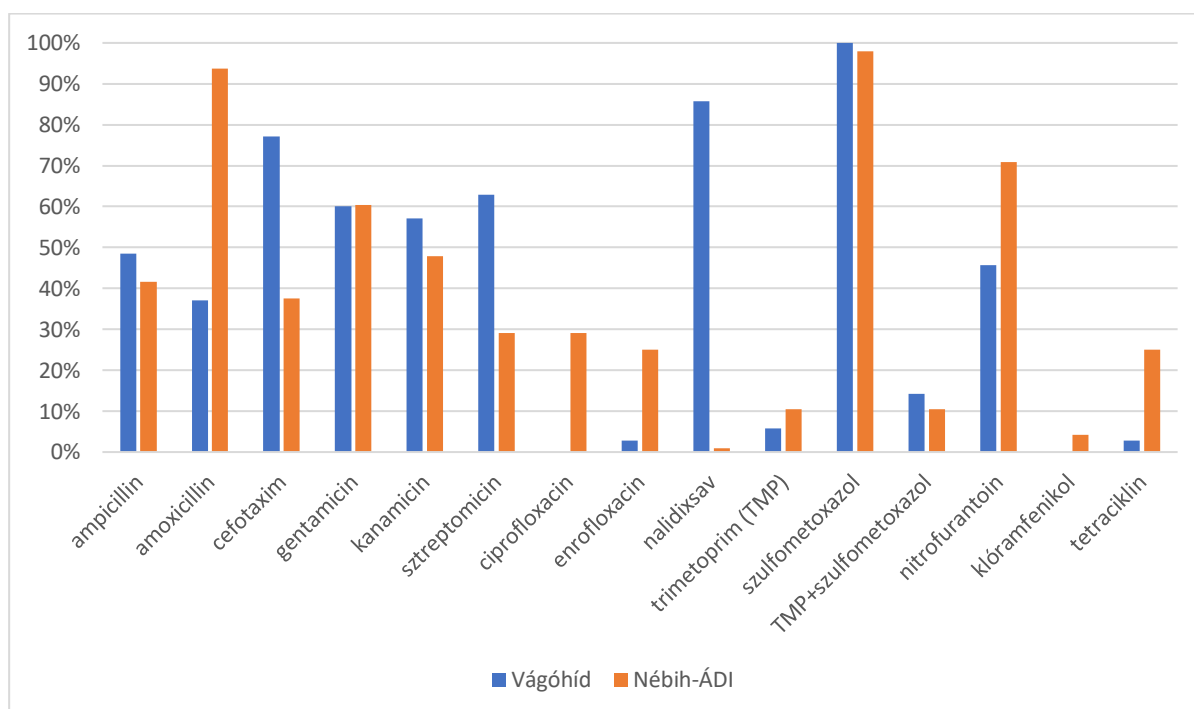
2016				
Eredet	Szerocsoportok	ECOR	Rezisztencia mintázatok	n=
Vakbél	O108	B2	¹ NFT,SMX	1
Vágott test	NT	A	¹ NFT,SMX	1
Vakbél	O108	B2	² NAL,NFT,SMX	4
Vágott test	O108	B2	² NAL,NFT,SMX	2
Vakbél	O108	B2	CTX,NFT,SMX	2
Vakbél	O108	B2	CTX,NAL,NFT,SMX	1
Vakbél	NT	B2	CTX,GEN,NAL,NFT,SMX	1
Vágott test	O14	A	AMP,CTX,NAL,NFT,SMX	1

2017				
Eredet	Szerocsoportok	ECOR	Rezisztencia mintázatok	n=
Vakbél	O14	A	CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	1
Vágott test	O14	A	AX,CTX,GEN,NAL,SMX,STR	1
Vakbél	O14	A	³ AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	2
Vágott test	O14	A	³ AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	2
Vágott test	O14	A	AMP,CTX,KAN,NAL,SMX,STR	1
Vakbél	O14	A	⁴ AMP,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	3
Vágott test	O14	A	⁴ AMP,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	4
Szennyvíz	O45	D	AMP,AMX,CTX,KAN,NAL,SMX,STR,SXT,TET,TMP	1
Vágott test	O14	B2	AMP,AMX,CIP,CTX,ENR,GEN,NAL,SMX,STR,SXT,TMP	1
Vakbél	NT	A	AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,SMX,STR	1
Vakbél	O14	A	⁵ AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX,STR	1
Vágott test	O14	A	⁵ AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX,STR	2
Vakbél	O14	A	⁶ AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	1
Vágott test	O14	A	⁶ AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,SMX,STR	1

Rövidítések: ¹: azonos rezisztencia mintázat, eltérő filogenetikai csoportok; ^{2,3,4,5,6}: azonos rezisztencia mintázatok, eltérő eredettel; NT=not typeable/nem tipizálható; AMX (amoxicillin), AMP (ampicillin), CTX (cefotaxim), CIP (ciprofloxacín), ENR (enrofloxacin), GEN (gentamicin), KAN (kanamicin), CHL (klóramfenikol), NAL (nalidixsav), NFT (nitrofurantoin), TET (tetraciklin), STR (sztreptomicin), TMP (trimetoprim), SMX (szulfometoxazol), SXT (szulfometoxazol+trimetoprim)

7.2.3 Antibiotikum rezisztencia

Az aEPEC törzseket jellemezve vizsgáltuk a törzsek (n=35) antibiotikum érzékenységét 10 csoportba tartozó 15-féle antibiotikummal az anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az antibiotikum rezisztencia gyakoriságát a 4. ábrán, valamint a kapott antibiotikum rezisztencia mintázatokat a 4. és 5. táblázatban összesítettük.



4. ábra Antibiotikum rezisztencia gyakoriságok a vágóhídon és a Nébih-ÁDI által gyűjtött mintákból származó aEPEC törzsek esetében.

5. táblázat A Nébih-ÁDI által gyűjtött mintákból származó aEPEC törzsek antibiotikum rezisztencia mintázatai és filogenetikai csoportjai.

Rezisztencia mintázatok	ECOR	n=
NAL,SMX	A	1
GEN,NAL,NFT,SMX,TET	B2	1
AMX,NFT,SMX	A	1
AMX,NAL,NFT,SMX	A	1
AMX,KAN,NAL,SMX,STR,SXT,TMP	B1	1
AMX,GEN,NAL,SMX	A	1
AMX,GEN,NAL,NFT,SMX	B2	1
AMX,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX,TET	A	2
AMX,GEN,CTX,NFT,NAL,SMX,TET	A	1
AMX,CTX,SMX	D	1
¹ AMX,CTX,KAN,NAL,SMX	A	1
¹ AMX,CTX,KAN,NAL,SMX	B2	1

AMX,CTX,KAN,NAL,NFT,SMX	A	4
AMX,CTX,GEN,KAN,NFT,SMX,STR,TET	A	1
AMX,CTX,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX,STR	A	1
AMX,CIP,GEN,CTX,NFT,NAL,STR,SMX,SXT	B2	1
AMX,CIP,GEN,CTX,ENR,NFT,NAL,STR,SMX	A	1
AMX,CIP,ENR,NAL,NFT,SMX	A	1
AMX,CIP,ENR,KAN,NAL,SMX,TET	B2	1
AMX,CIP,CTX,GEN,NAL,NFT,SMX	A	1
AMX,CIP,CTX,ENR,NFT,NAL,STR,SMX	B2	1
AMX,CIP,CTX,ENR,KAN,NFT,SMX,STR,SXT,TET,TMP	A	1
AMX,CIP,CTX,ENR,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX,STR	A	1
AMX,CIP,CTX,ENR,GEN,KAN,NAL,NFT,SMX	A	1
AMP,CHL,GEN,CIP,CTX,ENR,NFT,NAL,SMX,TET	A	1
AMP,AMX,NAL,SMX	A	1
AMP,AMX,KAN,NAL,SMX,STR	A	1
AMP,AMX,KAN,NAL,SMX	B2	1
AMP,AMX,GEN,NFT,KAN,SMX	A	1
AMP,AMX,GEN,KAN,NAL	A	1
AMP,AMX,GEN,CTX,NAL,STR,SMX	A	1
AMP,AMX,GEN,CIP,CTX,ENR,NFT,NAL,SMX,TMP,TET	D	1
AMP,AMX,CTX,NFT,NAL,STR,SMX,TET	A	1
AMP,AMX,CTX,NFT,NAL,STR,SMX	B1	1
² AMP,AMX,CTX,KAN,NAL,SMX	A	1
² AMP,AMX,CTX,KAN,NAL,SMX	B1	1
³ AMP,AMX,CTX,GEN,NAL,NFT,SMX	A	1
³ AMP,AMX,CTX,GEN,NAL,NFT,SMX	B1	1
AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NFT,SMX,STR,SXT,TMP	B1	1
AMP,AMX,CTX,GEN,KAN,NFT,NAL,SMX	A	1
AMP,AMX,CIP,GEN,CTX,ENR,NFT,NAL,STR,SMX,SXT,TET,TMP	D	1
AMP,AMX,CIP,ENR,GEN,NAL,NFT,SMX	A	1
AMP,AMX,CIP,CTX,GEN,KAN,NAL,NFT,STR,SMX	B2	1
AMP,AMX,CHL,ENR,GEN,KAN,NAL,SMX,STR,TET	A	1

Rövidítések: ^{1,2,3}: azonos rezisztencia mintázatok, eltérő ECOR; AMX (amoxicillin), AMP (ampicillin), CTX (cefotaxim), CIP (ciprofloxacin), ENR (enrofloxacin), GEN (gentamicin), KAN (kanamicin), CHL (klóramfenikol), NAL (nalidixsav), NFT (nitrofurantoin), TET (tetraciklin), STR (sztreptomycin), TMP (trimetoprim), SMX (szulfometoxazol), SXT (szulfometoxazol+trimetoprim)

Az antibiotikum rezisztencia értékek a vágóhídról származó aEPEC (n=35) törzsek esetében 2016 és 2017 között különbséget mutattak. Az aEPEC törzsek (n=13) 6 eltérő antibiotikum csoportba tartozó szerrel szemben bizonyultak rezisztensnek 2016-ban és szulfometoxazolra (SMX) és nitrofurantoinra (NFT) mindegyik rezisztensnek bizonyult. Míg 2017-ben az aEPEC törzsek (n=22) 9 antibiotikum csoportba tartozó szerrel szemben voltak rezisztensek (kivétel volt a klóramfenikol) és cefotaximra, sztreptomycinre, szulfometoxazolra mind rezisztens volt. A Nébih-ÁDI-ból származó aEPEC izolátumok 10 antibiotikum csoportba tartozó szerrel szemben voltak rezisztensek. A szulfometoxazol és amoxicillin rezisztencia volt a leggyakoribb (98% és 94%-kal), míg a nalidixsav és klóramfenikol rezisztencia volt a legalacsonyabb gyakoriságú (1% és 4%). (4. ábra)

A változatos és gyakori rezisztencia mellett az aEPEC törzsek gyakran multirezisztensnek bizonyultak, amennyiben legalább három antibiotikumra rezisztenciát mutattak. A multirezisztencia 94% és 98% volt a vágóhíd és a Nébih-ÁDI minták esetében. A vágóhídon (n=35) 16 és a Nébih-ÁDI esetében (n=48) 41 rezisztencia mintázatot lehetett megállapítani. (4. és 5. táblázatok)

Egyik izolátum esetében sem sikerült plazmidon kódolt kolisztin rezisztenciát kimutatni az *mcr1* génre kapott negatív eredmények alapján (Liu és mtsai., 2016).

7.3 Megbeszélés

A jelen munkánkban összesen 288 brojler eredetű *E. coli* törzset és ebből 83 aEPEC törzset azonosítottunk hazai mintákból. Az eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal azt találtuk, hogy a már leírt *E. coli* patotípusok gyakoriságában mi eltérő eredményt tapasztaltunk. A korábbi kutatások a baromfiból és vágóhídi mintáikból az aEPEC, EHEC, ETEC és EAEC jelenlétét mutatták ki (Alonso és mtsai., 2011; Dorigeraee és mtsai., 2016; Krause és mtsai., 2005; Lee és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2017), de ezek gyakorisága és rangsora változatosnak bizonyult (az aEPEC esetében 2,3% és 56% közötti gyakorisággal). A saját vizsgálatainkban kizárólag aEPEC törzseket azonosítottunk: az aEPEC törzsek gyakorisága 30% (118 mintából 35) körüli volt a vágóhídi minták és 28% (170 mintából 48) a Nébih-ÁDI referencia törzsek esetében. Ezek az értékek összhangban vannak a korábbi kutatások eredményeivel (lásd fentebb). Mindazonáltal a többi enterális patotípust nem sikerült sem a saját 118 izolátumunk és a Nébih-ÁDI törzseknél sem kimutatnunk. Ez az eltérés véleményünk szerint azzal magyarázható, hogy a mintáinkat közvetlenül a baromfiból nyertük, elkerülve az esetleges kontaminációt más húsforrásokból és a környezetből, ami a húsok tárolása során megtörténhet. Azt feltételezzük, hogy a húsok a tárolás során kontaminálódhatnak más húsforrásokból és ez eltérő patotípusokat és gyakorisági értékeket okozhat. A tény, hogy a szarvasmarha, juh, sertés a fő forrása, hordozója az EHEC, ETEC törzseknek, tovább erősíti előzőleg leírt gyanúkat (China és mtsai., 1996; Dubreuil és mtsai., 2016). További feltételezésünk, hogy a *stx2* pozitív *E. coli* korábbi kimutatása baromfik esetében (Bagheri és mtsai., 2014; Dorigeraee és mtsai., 2016; Farooq és mtsai., 2009) a galambokkal való szoros kontaktusnak tudható be, amely madárfaj gyakori hordozója az *stx2f* gént hordozó *E. coli* törzseknek (Dorigeraee és mtsai., 2016; Kobayashi és mtsai., 2002). Adataink alapján mi úgy gondoljuk, hogy a baromfifélék elsősorban aEPEC törzseket képesek hordozni.

A vágóhídi szennyvizet megvizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az szintén tartalmazhat aEPEC törzseket (jelen esetben egy O45 szerocsoportú és D filogenetikai csoportba tartozót). Mivel a vágóhídi szennyvízből izolált aEPEC törzsek más filogenetikai- és szerocsoportba tartoztak, felmerül, hogy ezen törzs nem baromfi eredetű és nem a madaraktól kerülhetett a szennyvízbe. Ez azonban nem zárja ki, hogy az esetlegesen patogén törzsek is kikerülhetnek ilyen módon a környezetbe és veszélyforrásként szolgálhatnak a későbbiekben.

A molekuláris genetikai vizsgálatok alapján elmondható, hogy minden izolált aEPEC törzs hordozója volt a *ler*, mint LEE (Locus of enterocyte effacement) regulátor gén és a *tir* (translocated intimin receptor) génnek az intimin hordozás mellett. A két gén fontos szerepet tölt be az EPEC törzsek által okozott bél mikrobohyok lemeztelenedésében, különösen a baktérium kihorgonyzásában az intimin és *tir* kapcsolódása révén. Ennek alapján az aEPEC

törzseink vélhetőleg alkalmasak lehetnek az EPEC törzsekre jellemző bélboholy leválás kialakításában.

Az aEPEC és a nem EPEC törzsek filogenetikai csoportjait összevetve megállapítható, hogy az aEPEC törzsek inkább a B2 (24% ellentétben a 3%-kal) és kevésbé a B1 (6% ellentétben a 25%-kal) csoportba tartoztak. A jelentősége ennek abban is lehet, hogy a B2 filogenetikai csoportba tartozók gyakran ExPEC törzsek, amelyek nagyobb esélyét jelenthetik a zoonotikus fertőzések létrehozásának (Ewers és mtsai., 2009; Jakobsen és mtsai., 2010). Mindemellett az aEPEC törzseink változatosnak mondhatóak, hiszen mind a négy filogenetikai csoport képviseltetve van a mintáinkban. Ez összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal a csoport heterogenitását illetően (Traumata és mtsai., 2008; Wang és mtsai., 2017). A szerocsoportok meghatározása tovább erősíti az aEPEC törzsek heterogenitásáról szóló véleményeket (Hernandes és mtsai., 2009; Trabulsi és mtsai., 2002), mivel három szerocsoportba tartoztak a mintáink (O14, O45, O108), amely szerocsoportok általában nem tartoznak a gyakorinak mondható aEPEC szerocsoportokba (Traumata és mtsai., 2008), de sertésekben kanadai és magyar kutatók is leírták (Helie és mtsai., 1991; Malik és mtsai., 2006; Zhou és mtsai., 1995). Elmondható viszont, hogy az azonos telepekről származó állatok esetében a szerocsoportokat egységesnek találtuk.

A 2016 és 2017-ben gyűjtött minták esetében nem sikerült a felnevelés során esetlegesen alkalmazott antibiotikumokról adatokat gyűjtenünk. Habár a növekvő antibiotikum rezisztencia mind az állat és ember orvoslás számára egyre nagyobb kihívást jelent. Az általunk bemutatott gyakori és széles körű rezisztencia megfelel a korábbi kutatások eredményeinek (Bagheri és mtsai., 2014; Croxen és mtsai., 2013; Depoorter és mtsai., 2012; Wang és mtsai., 2016; Yanmei és mtsai., 2018; Yu és mtsai., 2018). A saját mintáink esetében csak 2 (32 vágóhídi aEPEC mintából) és 1 (48 Nébih-ÁDI aEPEC mintából) aEPEC törzs nem bizonyult multirezisztensnek. A többi törzs széles körű és változatos rezisztencia mintázatokat mutattak, amely egy állományon belül is tetten érhető volt. Ezért ezen törzsek jelenléte az állatokban fokozott veszélyét jelentheti a rezisztencia gének terjedésének (Mellata, 2013). Valamint az állatorvosi kezelések hatástalanságával is járhat a mindennapi gyakorlatban, a baktériumok közötti rezisztencia gének kicserélődésének lehetősége által. A más kutatók által már csirkékben és fiatal macskákban bemutatott aEPEC társfertőzés mint hasmenést súlyosbító és akár magasabb elhullást okozóként (Pakpinyo és mtsai., 2002; Watson és mtsai., 2017), tovább erősíti a talált gyakori multirezisztens aEPEC törzsek jelentőségét. Ezen törzsek további rezisztencia gén donorként szolgálhatnak más baktériumok számára is.

8 Az aEPEC első leírása lúdból (*Anser anser domestica*) és aEPEC első közlése pulykákból és galambokból Magyarországon.

8.1 Anyagok és módszerek

8.1.1 Mintagyűjtés

A mintákat az NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (Nébih-ÁDI) baromfi hulláiból (8 házi tyúk, 8 kacsa, 10 liba, 1 pulyka telepről származók) és egy pulyka és egy víziszárnyas vágóhídon levágott egészséges állatokból, egy háztáji tyúkállományból és két házagalamb-állományból gyűjtöttük 2020-ban. Összesen 319 állat: 35 galamb, 42 tyúk, 87 kacsa, 101 lúd és 54 pulyka került vizsgálatra.

A mintavétel során próbáltunk eltérő életkorú állatokból (napostól 3 éves korig) származó mintákat gyűjteni egy baromfifajon belül, hogy az esetlegesen előforduló *E. coli* patotípusok életkori eloszlásáról is információkat gyűjthessünk. Az így nyert mintákat korosztályokba soroltuk a jobb összevethetőség és vizsgálódás érdekében mindegyik baromfi faj esetében egységes szempontok alapján.

A mintákat aseptikusan, steril mintavevő pálcával vettük az állatok vakbeléből az elhullott baromfik és a kloákából az élő baromfik (tyúkok, galambok) esetében. A mintákat 4 °C-on tartottuk a további feldolgozásukig.

8.1.2 Bakteriológia vizsgálatok

Minden mintát MacConkey táptalajra oltottunk ki, amiről egy laktóz pozitív telepet oltottuk tovább minden minta esetében, amíg szintenyészetet nem kaptunk. Ezt követően elsődleges (kataláz, oxidáz) és másodlagos (indol, metil-vörös, Voges-Proskauer, citrát hasznosítási próba) biokémiai reakciók segítségével erősítettük meg, hogy az izolált baktérium törzsek *E. coli* eredetűek-e valójában. A szintenyészeteket 15% glicerin hozzáadás mellett -80 °C-on tároltuk, mint törzsgyűjteményt a további felhasználásukig.

8.1.3 Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok

A gyűjtött *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztenciáját korong-diffúziós módszerrel határoztuk meg a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M100-S25, 2020) leírása alapján, a korábban a 7.1.2 fejezetben ismereteteknek megfelelően. A gátlási zónák mérete és a CLSI Enterobacteriaceae család ajánlásai alapján a törzseket rezisztens és érzékeny (az átmeneti kategóriát az érzékenybe soroltuk be) kategóriákba soroltuk be (CLSI-M100, 2020; CLSI-VET08, 2018). Referencia törzsként ATCC 25922 *E. coli* törzset alkalmaztunk.

A következő antibiotikumokra való rezisztenciát vizsgáltuk meg: penicillinek [ampicillin (10 µg)]; β-laktám/β-laktám gátló kombináció [amoxicillin-klavulánsav (20 µg/10 µg)];

cefalosporinok [cefotixin (30 µg)]; aminoglikozidok [gentamicin (10 µg), kanamicin (30 µg), sztreptomycin (10 µg)]; tetraciklinek [oxitetracliklin (30 µg)]; fluorokinolonok [ciprofloxacín (5 µg), enrofloxacin (5 µg)]; kinolonok [nalidixsav (30 µg)]; folsav szintézis gátlók [trimetoprim (30 µg), szulfometoxazol (300 µg), trimetoprim + szulfometoxazol (1.25 µg/23.75 µg)]; fenikolok [klóramfenikol (30 µg)]; nitrofuránok [nitrofurantoin (300 µg)]. Amennyiben egy *E. coli* törzs több mint négy antibiotikum csoport ellen mutatott rezisztenciát, multidrog-rezisztens (MDR) törzsnek minősítettük.

8.1.4 Molekuláris genetikai vizsgálatok

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz szükséges DNS templátokat a 7.1.3-as fejezetben már ismertetett forralásos módszerrel állítottuk elő.

A PCR master mixet a DreamTaq Green© DNS polimeráz (Thermo Scientific) és a hozzá tartozó puffer segítségével a gyártói utasítás alapján készítettük el, amely 0,5 µM primert tartalmazott minden reakcióban. A primerekkel kapcsolatos tudnivalókat a 3. táblázatban foglaltuk össze, illetve a 6. táblázatban található meg az időközben Clermont és mtsai. (2013) által leírt új az *E. coli* törzsek filogenetikai besorolásban alkalmazott primerek adatai.

A PCR során kapott amplikonokat gélelektroforézissel választottuk el egymástól és fényképezőgéppel dokumentáltuk a 7.1.3-as fejezetben leírtaknak megfelelően.

6. táblázat PCR-ben alkalmazott primerek szekvenciái és referenciái.

Génszakasz	Primer neve, szekvenciája (5'-3')	Referencia
<i>chuA</i>	ChuA.1b: ATGGTACCGGACGAACCAAC chuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Clermont és mtsai., 2013
<i>YjaA</i>	yjaA.1b: CAAACGTGAAGTGTCAGGAG yjaA.2b: AATGCGTTCCTCAACCTGTG	Clermont és mtsai., 2013
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b: CACTATTCGTAAGGTCATCC TspE4C2.2b: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	Clermont és mtsai., 2013
<i>arpA</i>	AceK.f: AACGCTATTCGCCAGCTTGC ArpA1.r: TCTCCCCATACCGTACGCTA	Clermont és mtsai., 2013

8.1.5 *E. coli* törzsek filogenetikai besorolása

Az izolált *E. coli* törzsek filogenetikai csoportjait Clermont és mtsai. (2013) által leírt quadruplex PCR (*chuA*, *yjaA*, *tspE4C2*, *arpA* génekre) reakcióval határoztuk meg.

8.1.6 Az eae pozitív *E. coli* törzsek szerotipizálása

Az O és H antigéneket az Ørskov és Ørskov (1984) által leírt agglutinációs módszer segítségével a Nemzeti Népegészségügyi Központban határoztuk meg.

8.1.7 Statisztikai elemzések

Az eae pozitív törzsek antibiotikum rezisztencia gyakorisági értékeit az ANOVA (95%-os konfidencia intervallummal) módszerrel hasonlítottuk össze az R (R Core Team, 2020) statisztikai program segítségével. A további adatok bonyolultságukat tekintve nem igényeltek további statisztikai vizsgálatokat ezen információk bemutatásához, illetve jobb megértésükhöz.

8.2 Eredmények

8.2.1 Baktérium törzsek

Összesen 332 mintát gyűjtöttünk össze. Minden állatból csak egy mintát vételeztünk. Az összes mintából, 319 esetben sikerült laktóz pozitív koliform törzset izolálnunk (n=35 galamb, n=42 tyúk, n=87 kacsa, n=101 lúd, n=54 pulyka), amelyek biokémiai vizsgálatokkal *E. coli* törzsnek bizonyultak. A Nébih-ÁDI-ban gyűjtött minták galambból (n=1), tyúkból (n=29), kacsából (n=36), lúdból (n=53) és pulykából (n=4) származtak. A háztájiból származó *E. coli* törzseket galambokból (n=34) és tyúkokból (n=13) izoláltuk. A vágóhídi minták kacsából (n=51), lúdból (n=48) és pulykából (n=50) származtak. (7. táblázat)

7. táblázat Gyűjtött minták és eae (intimin) pozitív törzsek életkori és faji megoszlása.

	Életkor	Galamb	H. tyúk*	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen
Nébih-ÁDI	0-1 hetes		14	27			41
	1-6 hetes			4	26	*2/4	34
	7-16 hetes				13		13
	15 hetes			4			4
	17 hetes-6 hónapos				3		3
	6 hónapos	*1/1					1
	6-12 hónapos				11		11
	1 év feletti		15	1			16
	Összesen		1	29	36	53	4
Háztáji	Fióka		*2/12				12
	3-4 hónapos		8				8
	6 hónapos		4				4
	2-3 éves		10	13			23
	Összesen		34	13			47
Vágóhíd	14 hetes			51			51
	16 hetes				*2/48		48
	20 hetes					50	50
	Összesen			51	48	50	149
Összegzés		35	42	87	101	54	319

*n/n = eae (intimin) pozitív minták/összes minta
H. tyúk* = Házityúk (*Gallus gallus domesticus*)

8.2.2 Kimutatott *E. coli* patotípusok

Egyik minta sem tartalmazott EHEC, ETEC, EAEC és EIEC patotípusba tartozó törzseket, az *stx1*, *stx2* (EHEC); *sta* és *lt1* (ETEC); *aggR* (EAEC); *ipaH* (EIEC) fő virulencia faktorokat kódoló génszakaszokra végzett vizsgálataink során kapott negatív eredmény alapján (Kaper, 2005). Azonban 7 minta esetében az *eae* (intimint kódoló adhesin) génszakasz kimutatható volt, így ezeket EPEC törzseknek tekintettük (Trabulsi és mtsai., 2002). Ezen EPEC törzseket aEPEC törzseknek azonosítottuk be az EAF (EPEC adherence factor) plazmid és az ezen kódolt *bfpA* génre végzett PCR vizsgálatok negatív eredménye alapján (Trabulsi és mtsai., 2002). Minden általunk izolált aEPEC törzs az EHEC és EPEC törzsekre jellemző fő virulencia faktort kódoló *tir* (translocated intimin receptor) gént is tartalmazta. Az aEPEC törzseinket pulykákból (n=2, Nébih-ÁDI, mindkettő 4 hetes állat), galambból (n=1, Nébih-ÁDI, 6 hónapos állat; n=2 - háztáji, mindkettő fióka) és lúdból (n=2, vágóhíd, mindkettő 16 hetes állat) izoláltuk.

8.2.3 Az aEPEC törzseink filogenetikai besorolása, szerotipizálása, antibiotikum rezisztenciája

Mindkettő pulykából származó aEPEC törzs multirezisztensnek minősült, de eltérő filogenetikai csoportba tartoztak, nevezetesen B1 (O/nem meghatározható: H/nem mozgó) és F (O76:H/nem mozgó). Az egyik pulyka eredetű aEPEC törzs nagy mértékű rezisztenciát mutatott, a 15 vizsgált antibiotikum közül 14-gyel szemben bizonyult rezisztensnek és csak gentamicinre volt érzékeny. Mindkettő lúd eredetű aEPEC törzs szintén multirezisztens volt a 9, illetve 11 antibiotikumra való rezisztenciájuk köszönhetően. Habár ezek azonos B2 filogenetikai csoportba és O145:H (spontán agglutináció) szerocsoportba tartoztak. A galamb aEPEC törzsek mind B1 filogenetikai csoportba tartoztak. Azonban ezen törzsek csak maximum négy antibiotikum ellen voltak rezisztensek és egyik törzs csak összesen 2 féle antibiotikummal szemben volt rezisztens. Az azonos tartási helyen lévő galambfiókákból izolált aEPEC törzsek azonos szerotípusba tartoztak (O109:H21). A 6 hónapos galambból gyűjtött aEPEC törzs O (nem meghatározható):H35 szerotípusba tartozott. (8. táblázat)

A pulykából és lúdból izolált aEPEC törzsek antibiotikum rezisztenciáját összehasonlítva a galambokból izolált aEPEC törzsekkel szemben szignifikánsan ($p=0,0037$) magasabbnak találtuk.

8. táblázat Az izolált aEPEC törzseink eredete, filogenetikai és szerocsoportjaik, valamint antibiotikum rezisztencia mintázatuk.

Állatfaj	Életkor	ECOR	Szerotípus	Antibiotikum rezisztencia mintázat
Pulyka	4 hetes	B1	O NT : NM	AMC, AMP, CHL, CIP, ENR, FOX, KAN, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Pulyka	4 hetes	F	O76 : NM	AMC, AMP, CHL, CIP, ENR, NAL, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Lúd	16 hetes	B2	O145 : H SP	AMC, AMP, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Lúd	16 hetes	B2	O145 : H SP	AMC, AMP, CIP, ENR, NAL, NIT, SMX, STR, SXT, TET, TMP
Galamb	fióka	B1	O109 : H21	AMP, NIT, SMX
Galamb	fióka	B1	O109 : H21	AMC, SMX
Galamb	6 hónapos	B1	O NT : H35	AMC, AMP, SMX, STR

Rövidítések: ECOR (filogenetikai csoport); szerotípus: NT (Not typable/nem tipizálható), NM (nem mozgó), SP (spontán agglutináció); AMC (amoxicillin-klavulánsav), AMP (ampicillin), CHL (klóramfenikol), CIP (ciprofloxacín), ENR (enrofloxacin), FOX (cefoxitin), KAN (kanamicin), NAL (nalidixsav), NIT (nitrofurantoin), SMX (szulfometoxazol), STR (sztreptomycin), SXT (szulfometoxazol+trimetoprim), TET (tetraciklin), TMP (trimetoprim)

8.3 Megbeszélés

A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján kevés információval rendelkezünk az aEPEC törzsek előfordulásáról az öt leggyakrabban haszonállatként tartott baromfi faj esetében. Valamint elmondható, hogy az állat életkorának az aEPEC előfordulási gyakoriságában játszott szerepéről szintén nem történtek még összehasonlító vizsgálatok. Így kutatásunk fő célja volt ezen kérdések megválaszolása.

Számos kutatócsoport kimutatta az aEPEC nagy gyakoriságát brojlerekben a vágási életkorban (5-6 hetes) illetve a levágott brojlerek testfelületéről (Alonso és mtsai., 2011; Dorigerae és mtsai., 2016; Lee és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2017). Továbbá számos vizsgálat felveti ezen aEPEC törzseknek a zoonotikus fertőzésekben való részvételét (Bélangier és mtsai., 2011; Manges és mtsai., 2016; Stromberg és mtsai., 2017). Azonban mi nem csak a vágási életkorban, hanem különböző életkorokban szeretnénk volna az aEPEC előfordulását feltérképezni. Ezen munkánk során a fiatal csirkékben (n=14, 3 telepről) és felnőtt tyúkokban (n=28, 6 telepről) nem sikerült aEPEC törzseket izolálnunk, habár más kutatók és saját korábbi munkánk során találtak alapján ezt feltételeztük volna (Alonso és mtsai., 2011; Lee és mtsai., 2009).

A mintavételezési időszakban (2020) kevés elhullott pulyka (n=4, 1 telepről) érkezett a Nébih-ÁDI-ba vizsgálatra, de ezekből is kettő, négy hetes pulykából izolált *E. coli* aEPEC-nek bizonyult. Ez az eredmény nem újdonság a korábbi közlemények alapján (Pakpinyo és mtsai., 2002), amelyekben azt is kimutatták, hogy az aEPEC-nek szerepe lehet ebben az állatfajban más társfertőzések kimenetelének befolyásolásában is (Guy és mtsai., 2000; Pakpinyo és mtsai., 2003) A vágóhídról származó és így az idősebb (kb. 20 hetes korú) pulykák esetében a mintákban (n=50) nem sikerült aEPEC törzseket kimutatni.

Az aEPEC kacsákban való jelenlétéről kevés információval rendelkezünk eddig (Farooq és mtsai., 2009) és nincsen eddigi említés a ludakkal kapcsolatban. A saját vizsgálataink alapján a kacsákban nem sikerült aEPEC jelenlétét kimutatni (n=87, 9 telepről), ami összhangban van más kutatások eredményével is (Sacristán és mtsai., 2014). Habár az eredményeink összehasonlíthatósága más kutatásokkal korlátozott, mivel az eddigi tanulmányokban nem tartották fontosnak és nem is közölték az állatok életkorával kapcsolatos információkat. A saját mintáink fiatal (n=31, 0-1 hetes), középkorú (n=55, 14-15 hetes) és egy esetben felnőtt kacsákból (1 évnél idősebb) származtak. A ludak esetében pedig elmondható, hogy az általunk izolált két aEPEC törzs az első irodalmi említése ezen baromfi fajban (*Anser anser domestica*). Ez a két minta érdekes módon a középkorú állatokból került kimutatásra, amelyeket tömással hizott libamáj előállításra tartottak.

Galamboknál 3 esetben sikerült aEPEC törzset kimutatni (n=1, Nébih-ÁDI, 6 hónapos madár; n=2, háztájából, fiókák). Más esetben és idősebb galamboknál nem sikerült aEPEC törzset izolálni. Eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal abban a tekintetben, hogy a galambok hordozói az aEPEC törzseknek. Habár ebben az esetben is korlátozott az eredmények összehasonlíthatósága, mert a korábbi kutatások az antibiotikum rezisztenciára és az *E. coli* virulencia gének meglétére fókuszáltak és nem közöltek életkori adatokat, ami vélhetőleg befolyással lehet az aEPEC előfordulására (Borges és mtsai., 2017; Farooq és mtsai., 2009; van Hoek és mtsai., 2019; Torres-Mejía és mtsai., 2018).

Eredményeinket és az irodalmi adatokat összegezve, úgy véljük, hogy az összes baromfi félében az aEPEC előfordulhat és hordozhatják őket. Azonban azt feltételezzük, hogy a madarak életkora, egyes környezeti feltételek (pl.: tömés) vagy betegségek (elhullott állatokból származó minták) befolyással lehetnek az aEPEC előfordulási gyakoriságára. Az eredményeink alapján a véleményünk, hogy a baromfik az életük első heteiben nem hordozói az aEPEC törzseknek jelentős mértékben, hanem csak az ezt követő életszakaszban 4-6 hetes korban vannak jelen jelentős számban a bélben egészséges (Alonso és mtsai., 2011) és beteg (Pakpinyo és mtsai., 2003) állatokban. A későbbi időszakban az aEPEC törzsek eltűnnek, számuk lecsökken, hasonlóan ahhoz, amit juhokban tapasztaltak (Martins és mtsai., 2016).

Az aEPEC törzsek antibiotikum rezisztenciáját összehasonlítva szignifikáns különbséget találtunk a pulyka, lúd és galamb eredetű törzsek esetében. A pulykák és ludak, mint intenzíven felnevelt állatok esetében nagyobb szükség van arra, hogy életük során gyógyszeres kezelésben részesüljenek. Feltételezésünk szerint ez is oka lehet a nagyobb mértékű antibiotikum rezisztencia gyakoriságnak pulyka és ludak esetében. Így a galambfiókáknál tapasztalt alacsony számú rezisztencia összefüggésben lehet a gyógyszeres kezelések hiányával ebben az életkorban. Azonban aEPEC törzsek esetében gyakori multirezisztencia, különösen a széles körben használt antibiotikumok ellen, felvetheti ezek terjedését a horizontális géntranszfer révén az embert megbetegítő törzsek irányába is.

A hét izolált aEPEC törzsből három az F és B2 filogenetikai csoportba tartozott, amelyek potenciálisan ExPEC törzseket tartalmaznak, így fokozottan veszélyesek zoonotikus fertőzések kialakítására. Továbbá az F és B2 (korábban mindkettő a B2 filogenetikai csoportba tartoztak) filogenetikai csoportokról elmondható, hogy nagyon gyakoriak az aEPEC törzsek esetében, ahogy ezt a korábbi munkánk során is hangsúlyoztuk. Az aEPEC törzsek szerotípusai a telepek tekintetében egységesnek bizonyultak, de változatosak (O76, O145, O109) voltak az állattartó telepeket összehasonlítva.

9 Összegző megbeszélés

Az *E. coli* egy széles körben előforduló többnyire kommenzalista baktérium, amely a normál bélflóra részeként részt vesz annak harmonikus egyensúlyának fenntartásában. Azonban léteznek patogén *E. coli* törzsek is, amelyek mind az emberben, mind az állatokban fertőzéseket tudnak létrehozni. A fertőzés kialakulásának helye szerint két nagy csoportba oszthatók, úgymint extraintesztinális és intesztinális törzsek, amelyekben belül további alcsoportok léteznek, amint azt a 4.sz (Irodalmi éttekintés) fejezetben ismertettem. Állatorvosi szempontból az intesztinális patogén *E. coli* törzsek esetében, az emberben okozott elváltozások alapján beazonosított EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC patotípusoknak van, illetve lehet megbetegítő szerepe. Az utóbbi évek kutatásainak eredményeképp a fenti, elsősorban humán enterális *E. coli* patotípusok mindegyikének a baromfiban való előfordulásáról is több kevesebb adat került napvilágra (Alonso és mtsai., 2011; Dorigerae és mtsai., 2016; Krause és mtsai., 2005; Lee és mtsai., 2009; Wang és mtsai., 2017).

Élelmiszer előállítás céljából tartott baromfifajok esetében ezen enterális patogén *E. coli* patotípusok akár potenciális vagy valódi zoonotikus kórokozóként, közegészségügyi veszélyeket is jelenthetnek. Ezek közül is külön kiemelendők az EPEC törzsek, amelyeket első human enterális kórokozóként írtak le az úgynevezett csecsemő diszpepsiát okozó *E. coli*-ként (Neter, 1965). Az említett EPEC törzsek közeli rokonságban állnak az EHEC törzsekkel, amelyek fontos zoonotikus törzseknek számítanak. Ugyanis az EHEC törzsek az EPEC törzsekből jöhettek létre az stx toxin géneket hordozó bakteriofágok felvételével (Tóth és mtsai., 2003). Ezért ezen törzsek elkülönítése mindenképpen fontos egymástól a lehetséges következmények mérlegelése szempontjából.

Az EPEC törzsek között további változatok fordulnak elő, amely a patomechanizmusban fontos szerepet játszó, ún. köteggépző pilus (BFP) termelődéssel van összefüggésben. Így megkülönböztetünk tipikus EPEC törzseket, amelyek képesek a köteggépző pilust termelni és atipikus EPEC törzseket, amelyekből ezen tulajdonság hiányzik és így más adhezinek segítségével jön létre a sejt, baktérium kapcsolat. A tEPEC törzsek elsősorban emberben és nyulakban fordulnak elő. Ellenben az aEPEC törzsek széles körben előfordulnak, így emberben is, és lehetnek megbetegedések forrásai mind emberben, mind állatokban. Az elmúlt évtizedek során a tEPEC okozta emberi megbetegedések számának csökkenése és a helyette megjelenő növekvő számú aEPEC okozta hasmenéses bántalmaknak, nem csak a fejlődő, hanem a fejlett világban is fontos emberi kórokozójává vált.

A nyúl EPEC törzsek, amelyek tulajdonságaik alapján a tEPEC törzsek közé tartoznak, a 90-es évek végétől nemzetközileg egyre szélesebb körben ismerté váltak (Milon et al., 1999). Ezek korábban Magyarországon is kevésbé voltak ismertek, amíg Dow és mtsai. (2005) a

hazai és közép-európai törzsek genetikai, valamint *in vitro* és *in vivo* patogenitási jellemzését nem közölték.

Az aEPEC törzseket számos állatfajban vizsgálatnak vetették már alá. Így társállatok közül macskában és kutyában több kutatási eredmény alapján összefüggést tudtak találni az aEPEC fertőzés és a hasmenéses esetek kimenetele között ezekben az állatfajokban. Továbbá az emberi fertőzések lehetséges forrásaiként is számba veszik ezeket az állatfajokat, amit a két faj (ember és állat) közötti szoros fizikai kontaktus még jobban elősegít.

A haszonállatokban végzett kutatások alapján bárányokban is gyakran izolálhatók az aEPEC törzsek, amelyek előfordulása az életkor előrehaladásával csökken. A bárányokban nagy gyakorisággal fordulhatnak elő EHEC-szerű törzsek is, amelyek létrejöhetnek egyes aEPEC törzsek Shiga toxint hordozó bakteriofágok felvételével. Ennek gyakorlati lehetőségét magyar kutatócsoport is kísérletesen bizonyította (Tóth és mtsai., 2003). A sertések hasmenéses eseteiből is gyakran kimutathatók speciális adhezineket hordozó aEPEC törzsek, amelyek hajlamosító tényezők mellett fokozottabban fordulhatnak elő magyar vizsgálatok alapján is (Malik és mtsai., 2006; Malik és mtsai., 2012).

A baromfiban végzett kutatások is hasonló eredménnyel jártak világszerte. Ennek megfelelően gyakori és változatos aEPEC törzsek előfordulását mutatták be, aminek fontos szerepe lehet a virulencia és antibiotikum rezisztencia gének hordozásában és továbbadásában is (Szmolka és mtsai., 2012; Malik és mtsai., 2017).

A jelen munkánkat megelőzően magyarországi adatok nem léteztek a baromfi aEPEC hordozása kapcsán, amelyet széles körben és nagy gyakorisággal sikerült munkánk során kimutatni brojlerekben és a rendelkezésünkre álló reprezentatív baromfi *E. coli* törzs gyűjteményen belül is. A kutatásunk megerősítette, hogy ezen törzsek nagy gyakorisággal hordoznak magukban számos antibiotikum rezisztencia gént is. Az irodalomban aEPEC törzsekkel kapcsolatos információk nem léteztek ludakban, így nekünk sikerült elsőként ennek a patotípusnak az előfordulását kimutatni és leírni ebben a madárfajban. A pulykában és galambban eddig adatok szintén nem voltak elérhetőek az aEPEC törzsekkel kapcsolatosan, amit a jelen munka eredményeképpen szintén be tudtunk mutatni.

A kutatásunk előremutató eredménye volt, annak felvetése a saját eredményeinken alapulva és az irodalmi adatokkal összevetve elsőként, hogy a baromfi fajok esetében az életkomak, valamint tartási körülményeknek, betegségeknek fontos szerepe lehet az aEPEC előfordulási gyakoriságában, annak befolyásolásában.

Bár a munkánk számos új, eddig nem ismert információval, adattal szolgált a tudományos élet számára és ezeket rangos, nemzetközileg is elismert külföldi folyóiratokban sikerült

leközölnünk. Azonban elmondható, hogy vizsgálataink nem lehettek teljeskörűek, az ehhez szükséges technikai és anyagi háttér szűkös volta miatt. Így a továbbiakban a hordozott intimin típusok, valamint az aEPEC törzsek *in vitro* és *in vivo* patogenitásának vizsgálata és az aEPEC törzseink esetleges fajspecifitásának tisztázása további munkákat igényel majd a jövőben.

Ennek ellenére a fentiek alapján reményünket tudjuk kifejezni, hogy az elvégzett és a fentiek szerint ez alapján a jövőben elvégzendő kutatások, jó alapját teremthetik meg a hazai- és nemzetközi enterális mikrobiológiai kutatásokban való részvételnek. Ezek eredményei az oktatásban (járványtan és élelmiszerbiztonság) is hasznosítható modern tudásanyagként szerepelhetnek.

10 Új tudományos eredmények

Céljainknak megfelelően kialakítottunk egy 437 izolátumból álló baromfi eredetű *E. coli* törzs gyűjteményt. Elvégeztük a kollekción humán enterális *E. coli* patotípusok virulencia marker génjeire való szűrését és nagyszámú aEPEC törzset azonosítottunk.

Ezen törzsek jellemzése során a következő új eredményeket értük el:

1. Magyarországon elsőként azonosítottunk házi tyúkból, pulykából, galambból aEPEC törzseket.
2. A kutatómunkánk során az irodalomban elsőként sikerült aEPEC törzseket ludakból (*Anser anser domestica*) izolálni és jellemezni.
3. Kutatásaink során elsőként sikerült olyan adatokat gyűjteni, melyek felvetik az aEPEC törzsek életkor szerinti előfordulási gyakoriságát.
4. A brojler EPEC törzsek feltűnően gyakori (25%-os) B2 filogenetikai reprezentációjára elsőként hívtuk fel a nemzetközi figyelmet.
5. Az aEPEC törzsek esetében változatos és széleskörű antibiotikum rezisztenciát és változatos szerocsoportokat sikerült kimutatnunk.
6. Egyes baromfi fajták esetében bemutattuk, hogy a gazda állatfaj és a kor befolyásolhatja az izolált aEPEC törzsek antibiotikum rezisztenciáját.
7. Az eredményeink alapján hazai viszonyok között az enterális *E. coli* patotípusok közül a baromfiban leginkább az aEPEC előfordulását tartjuk jellemzőnek.

11 Irodalom

1. Abri R, Javadi A, Asghari R, Razavilar V, Salehi TZ, Safaeeyan F, Rezaee MA. (2019) Surveillance for enterotoxigenic & enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from animal source foods in Northwest Iran. *Indian J Med Res* 150(1):87-91 doi:10.4103/ijmr.IJMR_2019_17
2. Adams LM, Simmons CP, Rezman L, Strugnell RA, Robins-Browne RM (1997) Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect Immun* 65(12):5222-5230 doi:10.1128/iai.65.12.5222-5230.1997
3. Alonso MZ, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA (2011) Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of the chicken slaughtering process. *Poult Sci* 90(11):2638-2641 doi:10.3382/ps.2011-01621
4. Arais LR, Barbosa AV, Andrade JRC, Gomes TAT, Asensi MD, Aires CAM, Cerqueira AMF (2018) Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. *Vet Microbiol* 227:45-51 doi:10.1016/j.vetmic.2018.10.023
5. Bagheri M, Ghanbarpour R, Alizade H (2014) Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. *Int J Food Microbiol* 177:16-20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.003
6. Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan (2018) *Escherichia coli* H-genotyping PCR: a complete and practical platform for molecular H typing. *J Clin Microbiol* 56(6):e00190-18. doi:10.1128/JCM.00190-18
7. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM (2011) *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62(1):1-10 doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x
8. Biswas S, Rolain JM (2013) Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods* 92(1):14-24 doi:10.1016/j.mimet.2012.10.014
9. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331):1453-1462 doi:10.1126/science.277.5331.1453

10. Borges CA, Cardozo MV, Beraldo LG, Oliveira ES, Maluta RP, Barboza KB, Werther K, Ávila FA (2017) Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. *J Microbiol* 55(5):344-8 doi:10.1007/s12275-017-6523-3
11. Bottari B, Bancalari E, Barera A, Ghidini S, Gatti M (2020) Evaluating the presence of human pathogens in commercially frozen, biologically appropriate raw pet food sold in Italy. *Vet Rec* 187(7):e50 doi: 10.1136/vr.105893
12. Brandal LT, Sekse C, Lindstedt BA, Sunde M, Løbersli I, Urdahl AM, Kapperud G (2012) Norwegian sheep are an important reservoir for human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4083-4091 doi:10.1128/AEM.00186-12
13. China B, Pirson V, Mainil J (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol* 62(9):3462-3465 doi:10.1128/aem.62.9.3462-3465.1996
14. China B, Goffaux F, Pirson V, Mainil J (1999) Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 178(1):177-82 doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13775.x
15. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4555-4558 doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
16. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5(1):58-65 doi:10.1111/1758-2229.12019
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.
19. CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. 2018.
20. Comery R, Thanabalasuriar A, Garneau P, Portt A, Boerlin P, Reid-Smith RJ, Harel J, Manges AR, Gruenheid S (2013) Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. *Appl Environ Microbiol* 79(12):3892-3896 doi:10.1128/AEM.00182-13

21. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26(4):822-880 doi:10.1128/CMR.00022-13
22. Depoorter P, Persoons D, Uyttendaele M, Butaye P, De Zutter L, Dierick K, Herman L, Imberechts H, Van Huffel X, Dewulf J (2012) Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. Int J Food Microbiol 159, 30–38 doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.07.026
23. Doregirae F, Alebouyeh M, Fasaee BN, Charkhkar S, Tajedin E, Zali MR (2016) Isolation of atypical enteropathogenic and shiga toxin encoding *Escherichia coli* strains from poultry in Tehran, Iran. Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench 9(1):53-57
24. Dow MA, Tóth I, Alexa P, Davies M, Malik A, Oswald E, Nagy B (2005) Predominance of *afr2* and *ral* fimbrial genes related to those encoding the K88 and CS31A fimbrial adhesins in enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from rabbits with postweaning diarrhea in Central Europe. J Clin Microbiol 43(3):1366-1371 doi:10.1128/JCM.43.3.1366-1371.2005
25. Dow MA, Tóth I, Malik A, Herpay M, Nógrády N, Ghenghesh KS, Nagy B (2006) Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and entero-aggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Libya. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 29(2-3):100-113 doi: 10.1016/j.cimid.2006.01.005
26. Drolet R, Fairbrother JM, Harel J, Hélie P (1994) Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. Can J Vet Res 58(2):87-92
27. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM (2016) Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus 7(1) doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016
28. Echeverria P, Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW (1993) Detection of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. J Infect Dis 167(2):458-461. doi:10.1093/infdis/167.2.458
29. EpiTools epidemiological calculators, Ausvet Pty Ltd. 2019, Accessed 17 December 2019 <http://epitools.ausvet.com.au>
30. Escherich T (1886) Morphologische Untersuchung der Darmbakterien. In: Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. Verlag von Ferdinand Enke, Stuttgart, pp 13-22
31. Ewers C, Antão EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH (2009) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Appl Environ Microbiol 75(1):184-192 doi: 10.1128/AEM.01324-08

32. Farooq S, Hussain I, Mir MA, Bhat MA, Wani SA (2009) Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett Appl Microbiol* 48(6):692-697. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02594.x
33. Fekete PZ, Schneider G, Olasz F, Blum-Oehler G, Hacker JH, Nagy B (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* 293(4):287-298 doi: 10.1078/1438-4221-00269
34. Fiederling F, Boury M, Petit C, Milon A (1997) Adhesive factor/rabbit 2, a new fimbrial adhesin and a virulence factor from *Escherichia coli* O103, a serogroup enteropathogenic for rabbits. *Infect Immun* 65(2):847-851 doi:10.1128/iai.65.2.847-851.1997
35. Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, Beutin L, Karch H (1994) Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* 32:2460–2463 doi:10.1128/jcm.32.10.2460-2463.1994
36. Friedmann HC (2014) Escherich and Escherichia. *EcoSal Plus* 6(1) doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0025-2013
37. Fröhlicher E, Krause G, Zweifel C, Beutin L, Stephan R (2008) Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol* 8:144 doi:10.1186/1471-2180-8-144
38. Goffaux F, China B, Janssen L, Mainil J (2000) Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res Microbiol* 151(10):865-871 doi:10.1016/s0923-2508(00)01153-0
39. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW (1995) Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 33:1375–1377 doi:10.1128/jcm.33.5.1375-1377.1995
40. Guy JS, Smith LG, Breslin JJ, Vaillancourt JP, Barnes HJ (2000) High mortality and growth depression experimentally produced in young turkeys by dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and turkey coronavirus. *Avian Dis* 44(1):105-113
41. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8(1):11-22. doi: 10.1093/dnares/8.1.11

42. Helie P, Morin M, Jacques M, Fairbrother JM (1991) Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect Immun* 59(3):814-821 doi:10.1128/iai.59.3.814-821.1991
43. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 297(2):137-149 doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x
44. van Hoek AHAM, van Veldhuizen JNJ, Friesema I, Coipan C, Rossen JWA, Bergval IL, Franz E (2019) Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of *stx2f*-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* 20(1):271 doi: 10.1186/s12864-019-5635-z
45. Hu J, Torres AG (2015) Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect* 21(8):729-734 doi:10.1016/j.cmi.2015.01.015
46. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan (2015) *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol* 53(8):2427-2432 doi:10.1128/JCM.00321-15
47. Jakobsen L, Spangholm DJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg HD, Agersø Y, Aarestrup FM, Hammerum AM, Frimodt-Møller N (2010) Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol* 142(1-2):264-72 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.025
48. Kaper JB (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295(6-7):355-356 doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.008
49. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G (2021) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens* 10(4):467 doi: 10.3390/pathogens10040467
50. Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, Watahiki M, Nagai Y (2005) Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol Immunol* 49:485–492. doi:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03752.x
51. Kinnula S, Hemminki K, Kotilainen H, Ruotsalainen E, Tarkka E, Salmenlinna S, Hallanvuo S, Leinonen E, Jukka O, Rimhanen-Finne R (2018) Outbreak of multiple strains of non-O157 shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* associated with rocket salad, Finland, autumn 2016. *Euro Surveill* 23(35):1700666. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.35.1700666

52. Kjaergaard AB, Carr AP, Gaunt MC (2016) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in association with acute gastroenteritis in 7 dogs from Saskatchewan. *Can Vet J* 57(9):964-968
53. Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S (2002) Prevalence and characteristics of intimin-and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J Vet Med Sci* 64:1071–1073 doi:10.1292/jvms.64.1071
54. Kozłowska K, Glinkowska M, Boss L, Gaffke L, Deptuła J, Węgrzyn G (2020) Formation of complexes between O proteins and replication origin regions of shiga toxin-converting bacteriophages. *Front Mol Biosci* 7:207 doi:10.3389/fmolb.2020.00207
55. Krause G, Zimmermann S, Beutin L (2005) Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* 106(1-2):87-95 doi:10.1016/j.vetmic.2004.11.012
56. Krejany EO, Grant TH, Bennett-Wood V, Adams LM, Robins-Browne RM (2000) Contribution of plasmid-encoded fimbriae and intimin to capacity of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli* to attach to and colonize rabbit intestine. *Infect Immun* 68(11):6472-6477 doi:10.1128/IAI.68.11.6472-6477.2000
57. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS (2009) Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Int J Food Microbiol* 134(3):196-200 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.013
58. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16(2):161-168 doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
59. Lopes LM, Fabbriotti SH, Ferreira AJ, Kato MA, Michalski J, Scaletsky IC (2005) Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol* 43(4):1968-1972 doi:10.1128/JCM.43.4.1968-1972.2005
60. Malik A, Tóth I, Fekete PZ, Beutin L, Nagy B (2006) Béli mikrobaholy-károsodást okozó enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC) baktériumok választott malacokban. *Magy Áo Lapja* 128:473-485
61. Malik A, Tóth I, Beutin L, Schmidt H, Taminiau B, Dow MA, Morabito S, Oswald E, Mainil J, Nagy B (2006) Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae+* *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet Microbiol* 114(1-2):82-93 doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.044
62. Malik A, Tóth I, Nagy B (2012) Colonisation of conventional weaned pigs by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and its hazard potential for human health. *Acta Vet Hung* 60(3):297-307 doi:10.1556/AVet.2012.025

63. Malik A, Nagy B, Kugler R, Szmolka A (2017) Pathogenic potential and virulence genotypes of intestinal and faecal isolates of porcine post-weaning enteropathogenic *Escherichia coli*. Res Vet Sci 115:102-108 doi:10.1016/j.rvsc.2017.02.002
64. Manges AR (2016) *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. Clin Microbiol Infect 22(2):122-129 doi:10.1016/j.cmi.2015.11.010
65. Martins FH, Guth BE, Piazza RM, Elias WP, Leão SC, Marzoa J, Dahbi G, Mora A, Blanco M, Blanco J, Pelayo JS (2016) Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. Vet Microbiol 196:72-77 doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.009
66. Mellata M (2013) Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog Dis 10:916–932 doi:10.1089/fpd.2013.1533
67. Mellies JL, Benison G, McNitt W, Mavor D, Boniface C, Larabee FJ (2011) *Ler* of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein–DNA complexes. Microbiology 157:1123–1133 doi:10.1099/mic.0.046094-0
68. Milon A, Oswald E, De Rycke J (1999) Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Vet Res 30(2-3):203-219
69. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun. 41(3):1340-1351 doi:10.1128/iai.41.3.1340-1351.1983
70. Moura RA, Sircili MP, Leomil L, Matté MH, Trabulsi LR, Elias WP, Irino K, Pestana de Castro AF (2009) Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. Appl Environ Microbiol 75(23):7399-7408 doi:10.1128/AEM.00636-09
71. Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int J Med Microbiol 295(6-7):443-454. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.003
72. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11(1):142-201 doi:10.1128/CMR.11.1.142
73. Neter E (1965) Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. Amer J Dig Dis 10:883-890
74. Nguyen Y, Sperandio V (2012) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol 2:90 doi:10.3389/fcimb.2012.00090
75. Ogura Y, Ooka T, Whale A, Garmendia J, Beutin L, Tennant S, Krause G, Morabito S, Chinen I, Tobe T, Abe H, Tozzoli R, Caprioli A, Rivas M, Robins-Browne R, Hayashi T, Frankel G (2007) TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. Infect Immun. 75(2):604-612 doi: 10.1128/IAI.01491-06.

76. Ørskov F, Ørskov I (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol* 14:43–112 doi:10.1016/S0580-9517(08)70447-1
77. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME, Mars-Groenendijk RH, Trip H, Molhoek EM, Jansen HJ, van der Plas J, de Jong AL, Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Speksnijder AG (2015) Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 305:446–452 doi:10.1016/j.ijmm.2015.04.001
78. Pakpinyo S, Ley DH, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Guy JS (2002) Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. *Avian Dis* 46(2):360-369 doi:10.1637/0005-2086(2002)046[0360:POEECI]2.0.CO;2
79. Pakpinyo S, Ley DH, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Guy JS (2003) Enhancement of enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity in young turkeys by concurrent turkey coronavirus infection. *Avian Dis* 47(2):396-405 doi:10.1637/0005-2086(2003)047[0396:EOEECP]2.0.CO;2
80. Persad AK, LeJeune JT (2014) Animal reservoirs of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2(4):EHEC-0027-2014 doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
81. Puño-Sarmiento J, Medeiros L, Chiconi C, Martins F, Pelayo J, Rocha S, Blanco J, Blanco M, Zanutto M, Kobayashi R, Nakazato G (2013) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol* 166(3-4):676-680 doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.007
82. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. (2004) Enterobacteriaceae. In: *Veterinary Microbiology*. Elsevier, Spain, pp 209-236
83. R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020, R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>
84. Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C (2009) Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrhoeic faecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 106(2):455-458 doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04013.x
85. Rodrigues J, Thomazini CM, Lopes CA, Dantas LO (2004) Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. *J Clin Microbiol* 42(3):1388-1389 doi:10.1128/JCM.42.3.1388-1389.2004
86. Sacristán C, Esperón F, Herrera-León S, Iglesias I, Neves E, Nogal V, Muñoz MJ, de la Torre A (2014) Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian Pathol* 43(2):172-175 doi:10.1080/03079457.2014.897683

87. Saidenberg AB, Knöbl T, Melville PA, Zuniga E, Salaberry SR, Benites NR, Brandão PE (2017) An atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolate with possible human and domestic animal origin from a free-living lemur's macaw (*Anodorhynchus leari*). *J Wildl Dis* 53(2):396-398 doi:10.7589/2016-02-031
88. Sancak AA, Rutgers HC, Hart CA, Batt RM (2004) Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Vet Rec* 154(4):101-106 doi:10.1136/vr.154.4.101
89. Sekse C, Sunde M, Lindstedt BA, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, Urdahl AM (2011) Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. *Appl Environ Microbiol* 77(14):4949-4958 doi:10.1128/AEM.00189-11
90. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss R Rd, Mellata M (2017) Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One* 12(7):e0180599 doi:10.1371/journal.pone.0180599
91. Szmolka A, Anjum MF, La Ragione RM, Kaszanyitzky EJ, Nagy B (2012) Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet Microbiol* 156(1-2):110-118 doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.030
92. Tóth I, Schmidt H, Dow M, Malik A, Oswald E, Nagy B (2003) Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl Environ Microbiol* 69(12):7242-7247 doi:10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003
93. Tóth I, Sváb D, Bálint B, Brown-Jaque M, Maróti G (2016) Comparative analysis of the Shiga toxin converting bacteriophage first detected in *Shigella sonnei*. *Infect Genet Evol* 37:150-157 doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.022
94. Teixeira NB, Rojas TCG, Da Silveira WD, Matheus-Guimarães C, Silva NP, Scaletsky ICA (2015) Genetic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. *BMC Microbiol* 15:200 doi:10.1186/s12866-015-0539-9
95. Torres-Mejía AM, Blanco-Peña K, Rodríguez C, Duarte F, Jiménez-Soto M, Esperón F (2018) Zoonotic agents in feral pigeons (*Columba livia*) from Costa Rica: possible improvements to diminish contagion risks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 18(1):49-54 doi:10.1089/vbz.2017.2131
96. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8(5):508-513 doi:10.3201/eid0805.010385
97. Tramuta C, Robino P, Nebbia P (2008) Phylogenetic background of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from animals. *Vet Res Commun* 32(6):433-437 doi:10.1007/s11259-008-9042-1

98. Treier A, Stephan R, Stevens MJA, Cernela N, Nüesch-Inderbinnen M (2021) High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw meat-based diets for companion animals - a public health issue. *Microorganisms* 9(8):1556 doi: 10.3390/microorganisms9081556
99. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) *Escherichia coli* okozta betegségek. In: A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Magyarország, pp 117-129
100. Vasco K, Graham JP, Trueba G (2016) Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Appl Environ Microbiol* 82(14):4218-4224 doi:10.1128/AEM.00795-16
101. Wang L, Nakamura H, Kage-Nakadai E, Hara-Kudo Y, Nishikawa Y (2017) Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int J Food Microbiol* 249:44-52 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003
102. Watson VE, Jacob ME, Flowers JR, Strong SJ, DebRoy C, Gookin JL (2017) Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* with diarrhea and related mortality in kittens. *J Clin Microbiol* 55(9):2719-2735 doi:10.1128/JCM.00403-17
103. Watson VE, Jacob ME, Bruno-Bárcena JM, Amirsultan S, Stauffer SH, Píqueras VO, Frias R, Gookin JL (2019) Influence of the intestinal microbiota on disease susceptibility in kittens with experimentally-induced carriage of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 231:197-206 doi:10.1016/j.vetmic.2019.03.020
104. Watson VE, Hazen TH, Rasko DA, Jacob ME, Elfenbein JR, Stauffer SH, Gookin JL (2020) Comparative genomics of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from kittens and children identifies bacterial factors associated with virulence in kittens. *Infect Immun* IAI.00619-20 doi:10.1128/IAI.00619-20
105. Xu Y, Bai X, Jin Y, Hu B, Wang H, Sun H, Fan R, Fu S, Xiong Y (2017) High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 7:109 doi:10.3389/fcimb.2017.00109
106. Yanmei X, Hui S, Xiangning B, Shanshan F, Ruyue F, Yanwen X (2018) Occurrence of multidrug-resistant and ESBL-producing atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in China. *Gut Pathog* 10:8 doi:10.1186/s13099-018-0234-0
107. Zhou Y, Zhu X, Hou H, Lu Y, Yu J, Mao L, Mao L, Sun Z (2018) Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among children under 5 years of age with acute diarrhea: a hospital based study. *BMC Infect Dis* 18(1):63. doi:10.1186/s12879-017-2936-1
108. Zhu C, Harel J, Jacques M, Fairbrother JM (1995) Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* 59(2):118-123

12 A doktori kutatás eredményeinek közlései

Adorján A, Makrai L, Mag T, Jánosi S, Könyves L, Tóth I (2020) High frequency of multidrug-resistant (MDR) atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in broilers in Hungary. Front Vet Sci 7:511 doi:10.3389/fvets.2020.00511 Tudományosmetria: D1 – Impakt faktor: 3,412

Adorján, A, Makrai, L, Könyves, L, Tóth, I (2021) Enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC). Rövid irodalmi összefoglaló. MÁL 143(7):429-438 Tudományosmetria: Q4 – Impakt faktor: 0,22

Adorján A, Thuma Á, Könyves L, Tóth I (2021) First isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from geese (*Anser anser domestica*) and first description of atypical EPEC from turkeys and pigeons in Hungary. BMC Vet Res 17(1):263 doi:10.1186/s12917-021-02968-w Tudományosmetria: Q1 – Impakt faktor: 2,741

13 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet elsőként kifejezni az Állatorvostudományi Kutatóintézetnek, hogy lehetőséget adott, hogy a PhD kutatásom jelentős részét az intézet falai között végezhessem el. Valamint Dr. Tóth Istvánnak témavezetőmnek, hogy a számomra akkor még ismeretlen tudomány területre beengedve, életre szóló alapismeretekkel vértezett fel.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sváb Domonkosnak, aki mindenkor segítőkész volt mind a technikai, mind elméleti problémák megvitatásában, elsajátításában, megbeszélésében.

További köszönet illeti Dr. Könyves Lászlót és az ÁTE Állathigiénia, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika valamennyi munkatársát, aki lehetőséget teremtett, hogy a tanszéki munkám mellett a doktori fokozat megszerzéséhez szükséges munkámat is elvégezhessem, valamint anyagi háttérrel tudott biztosítani a kutatáshoz szükséges anyagok beszerzésében és a publikációk rangos helyen való megtételében.

Bár nem a közepén illetné a köszönet, de Dr. Fodor László, mint közvetlen munkatárs, tanácsaival, bátorításával, minden pillanatban segíteni akarásával örökre lekötelezetté tett, amit sajnós érzésem szerint nem tudtam időközben kellőképpen viszonzni.

A Járványtani tanszéken köszönetemet kell kifejeznem Dr. Makrai Lászlónak, aki számtalan fázisában a kutatómunkának elengedhetetlen segítségül szolgált és fontos dolgokra hívta fel a figyelmemet. Halasi Teréz és Jutasi Alexandra asszisztenseknek, akik megteremtették a gyakorlati munka háttérét, így reflektorfénybe nem kerül sosem az áldozatos munkájuk, de nélkülük nem sikerülhetett volna.

Meg kell említenem még Dr. Szmolka Annamária és Dr. Nagy Béla segítségét is, ami néha csak pár szó, vagy tett volt, de nekem sokat jelentett a munkám során.

Az egyetemen kívüli szervezetekből meg kell említenem Dr. Jánosi Szilárdot, aki lehetővé tette, hogy a referencia törzseiket használjam és felhasználjam a témámban, valamint Dr. Mag Tündét és Dr. Tóth Szilárdot az NNK-ból a kéziratok elkészítéséhez nélkülözhetetlen, de fárasztó szerotipizálás elvégzéséért.

Bár a végére maradt, de nehéz sorrendbe tenni a sok embert, aki a munka létrejöttében részt vet. De a szüleim (Gyuricza Anna, Adorján István), feleségem (Adorján-Biró Zsuzsanna) mindvégig ott álltak mellettem és amikor már feladni szándékoztam volna, akkor ők adták az erőt annak tovább folytatására. Így nélkülük a fentebb leírt köszönetnyilvánítások sem jöhettek volna létre, amiért külön köszönet illeti őket.

A doktori munkám során az alábbi források kerültek felhasználásra, amelyek segítségével a kutatási feladatok, valamint a publikációk megvalósulhattak.

EFOP-3.6.1.-16-2016-00024, projekt címe: Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának együttműködésében.

NKFIH-124335, projekt címe: Szarvasmarha eredetű Shiga toxikus és kommenzalista *E. coli* és bakteriofágok jellemzése.

EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, projekt címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával.